

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DES SCIENCES

Étude de différents facteurs intervenant dans l'induction de
l'enzyme 3α - Hydroxystéroïde : NAD - Oxydoréductase
de *Pseudomonas testosteroni*

THÈSE

présentée

à la Faculté des Sciences de MONTPELLIER

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences Physiques

par

Yvon MICHEL-BRIAND

*Docteur en Médecine · Licencié ès Sciences · Chef de Travaux à la Faculté de Médecine
Assistant des Hopitaux*

Soutenue le Novembre 1967 devant la Commission d'Examen

JURY :

M. KAHANE

Président

M^{me} GUASTALLA

M. ROUX

M. COHEN

} *Assesseurs*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551915_0020

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTÉ DES SCIENCES

Étude de différents facteurs intervenant dans l'induction de
l'enzyme 3α - Hydroxystéroïde : NAD - Oxydoréductase
de *Pseudomonas testosteroni*

THÈSE

présentée

à la Faculté des Sciences de MONTPELLIER

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences Physiques

par

Yvon MICHEL-BRIAND

*Docteur en Médecine - Licencié ès Sciences - Chef de Travaux à la Faculté de Médecine
Assistant des Hopitaux*

Soutenue le Novembre 1967 devant la Commission d'Examen

JURY :

M. KAHANE

Président

M^{me} GUASTALLA

M. ROUX

M. COHEN

} *Assesseurs*



LISTE DES PROFESSEURS

DOYEN : A. CASADEVALL

ASSESSEURS : Ch. SAUVAGE - P. DUMONTET

DOYEN HONORAIRE : P. MATHIAS

PROFESSEURS HONORAIRES :

R. JACQUES
M. CASTERAS
E. CARRIERE
E. TURRIERE

J. SOULA
G. DENIZOT
J. GRANIER
Ch. BOUHET

PROFESSEURS TITULAIRES :

M. M. MOUSSERON
M. L. EMBERGER
M. J.P. ROIG
M. P. CHATELAIN
Mlle O. TUZET
Mlle G. CAUQUIL
M. G. COUCHET
M. J. SALVINIEN
Mlle A.M. VERGNOUX
M. J. AVIAS
M. P. VIELES
M. J. RABINOVITCH
M. E. KAHANE
M. J.J. MOREAU
M. B. CHARLES
M. J. MOTTE
M. R. JOUTY
M. P. DUMONTET
M. R. LEGENDRE
M. I. ASSENMACHER
M. A. CASADEVALL

Chimie Organique
Botanique
Physique
Minéralogie et Cristallographie
Zoologie
Chimie Organique
Mécanique Supérieure
Chimie-Physique
Physique
Géologie
Chimie
Physique (C.S.U.P.)
Chimie Biologique
Mécanique Rationnelle
Mathématiques Pures
Biologie Végétale
Physique
Physique
Zoologie
Physiologie Animale
Chimie Organique

M. B. PISTOULET	Physique
M. Ch. ROUMIEU	Analyse Supérieure
M. J. ROBIN	Physique
M. A. POTIER	Chimie Minérale
M. R. LAFONT	Physique
M. R. JACQUIER	Chimie
M. J. FALGUEIRETTES	Minéralogie
M. J. REGNIER	Chimie
Mme J. CHARLES	Mathématiques
M. P. CAILLON	Physique
M. J. ROUZAUD	Chimie
M. Ch. SAUVAGE	Botanique
M. H. CHRISTOL	Chimie (E.N.S.I.)
M. A. MARTINEAU	Mathématiques
Mme G. VERNET	Biologie Animale
M. L. CECCHI	Physique
M. H. ANDRILLAT	Astronomie

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

Mme M.L. de POUQUES	Botanique (C.S.U.P.)
M. P. MURAOUR	Géophysique appliquée
Mme M. LAFON	Mathématiques
M. M. MATTAUER	Géologie
M. G. TOURNE	Chimie
M. L. EUZET	Zoologie (C.S.U.P.)
M. J. REMY	Géologie
M. P. DEMANGEON	Géologie
M. A. BONNET	Botanique
M. M. SAVELLI	Physique
M. G. DELOUPY	Physique
Mme S. ROBIN	Physique
M. L. GRAMBAST	Botanique
M. J.P. LAFON	Mathématiques
Mme Ch. DUBOUL-RAZAVET	Géologie (C.S.U.P.)
M. E. GROUBERT	Physique
Mme H. GUASTALLA	Biologie Physico-chimique
M. G. LAMATY	Chimie
M. F. PROUST	Géologie
Melle A. BAILLETTE	Mathématiques (C.S.U.P.)

MAITRES DE CONFERENCES :

M. R. GAUFRES	Chimie
M. A. BASSOMPIERE	Physique
M. R. MARTY	Psycho-Physiologie
M. M. MAURIN	Chimie
M. J.J. SOULIER	Chimie (C.S.U.P.)
M. J. PARIS	Zoologie
M. P. MOLINO	Mathématiques
M. N. ROBY	Mathématiques (C.S.U.P.)
Mme PARIS-PIREYRE	Physiologie Végétale
M. G. BOUGNOT	Physique
M. Y. GUITTON	Physiologie Végétale (C.S.U.P.)
M. F. BOMBRE	Physique (C.S.U.P.)
M. C. PUISSEGUR	Biologie Animale (C.S.U.P.)
M. P. VIALLET	Chimie (C.S.U.P.)
M. L. THALER	Géologie
N.	Mathématiques (M. BOUIX)

CHARGES D'ENSEIGNEMENT :

M. M. LEFRANC	Mathématiques
M. A. STURER	Mathématiques
M. J. LEGRAND	Physiologie Animale

SECRETAIRE PRINCIPAL :

E. SIAU

o

o o

A Monsieur le Professeur KAHANE

*Professeur à la Faculté des Sciences
notre Président de thèse*

A Madame le Professeur GUASTALLA

Professeur à la Faculté des Sciences

A Monsieur le Professeur ROUX

Professeur à la Faculté de Médecine

A Monsieur le Professeur COHEN

*Directeur de Recherche au Centre
National de la Recherche Scientifique*

A V A N T P R O P O S

Ce travail est le résultat de recherches effectuées au Laboratoire de Microbiologie et Virologie de la Faculté de Médecine que dirige Monsieur le Professeur ROUX.

Monsieur le Professeur ROUX nous a guidé tout au long de nos études, il nous a permis de parfaire notre formation. Auprès de lui, nous avons appris à manipuler avec soin et à juger avec nuance. Nous le remercions de nous avoir accordé les moyens nécessaires à l'exécution de ce travail.

Qu'il soit assuré de notre profond attachement et de notre gratitude.

Monsieur le Professeur COHEN nous a accueilli à plusieurs reprises dans son Service. Malgré ses responsabilités, il a toujours été disponible pour nous conseiller dans notre travail et il nous a guidé pas à pas dans nos dernières recherches.

Nous lui exprimons notre grande reconnaissance et notre respectueuse admiration.

Nous adressons nos remerciements à Monsieur le Professeur KAHANE pour la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée et pour les précieux conseils qu'il nous a donnés dans la rédaction de ce mémoire.

Nous remercions également Madame le Professeur GUASTALLA pour les précisions qu'elle nous a apportées et pour le sujet de thèse complémentaire qu'elle a bien voulu nous proposer.

Nous sommes particulièrement reconnaissant à Monsieur CRASTES de PAULET, Professeur de Biochimie Médicale, des encouragements qu'il nous a prodigués et de l'aide qu'il nous a apportée en nous permettant d'apprendre dans son Laboratoire les techniques propres à l'étude des stéroïdes.

Nos remerciements vont également à Monsieur BENEZECH, Professeur de Physique Médicale, Doyen de la Faculté de Médecine et à Monsieur MOUSSERON Professeur à la Faculté des Sciences, Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, ainsi qu'à tous ceux qui nous ont conseillé et ouvert leur Laboratoire : Monsieur BUTTIN, Sous-Directeur de

Recherche au Collège de France; Monsieur FLOCH, Professeur de Biochimie Médicale, Directeur de l'Ecole de Médecine de Brest; Monsieur LISSITZKY, Professeur de Biochimie Médicale à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille; Monsieur SENEZ, Directeur de Recherche au C N R S, Professeur à la Faculté des Sciences de Marseille; Monsieur ZUCKERKANDL, Directeur de Recherche au C N R S, Professeur associé à la Faculté des Sciences de Montpellier.

Nous assurons de notre sympathie tous nos collègues de laboratoire pour les services qu'ils nous ont rendus.

Notre reconnaissance va enfin au Centre National de la Recherche Scientifique qui nous a apporté une aide matérielle dans le cadre de la RCP n°70.

o

o c

S O M M A I R E

	Page :
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES	5
I- Culture des bactéries	6
1°- Souche bactérienne	6
2°- Milieux de culture	9
3°- Techniques de culture et d'induction	10
4°- Moyens d'étude de la croissance microbienne	11
II- Obtention de l'extrait enzymatique	12
1°- Séparation des bactéries	12
2°- Disruption des bactéries	12
III- Dosage enzymatique	14
1°- Détermination des meilleures conditions de dosage	14
A- Recherche du pH optimum et des concentra-	
tions ioniques optimales	14
B- Température	15
C- Substrat	15
D- Nicotinamide-adénine-nucléotide (NAD ⁺)	
Rôle de la concentration	15
E- Extraits enzymatiques	16
2°- Réaction enzymatique	17
A- Exécution de la réaction	17
B- Lecture et expression des résultats	18
C- Dosage enzymatique d'extrait purifié	18
IV- Dosage des protéines	20
V- Purification de l'enzyme	21
1°- Précipitation des acides nucléiques par le	
sulfate de streptomycine	21
2°- Précipitation par le sulfate d'ammonium	21
3°- Filtration sur gel de dextrane	22
4°- Electrophorèse en veine liquide	22
VI- Etude des stéroïdes	24
1°- Extraction des stéroïdes	24
2°- Chromatographie sur couche de gel de silice	24
3°- Mesure de l'absorption en lumière ultra-violette	25
4°- Mesure de l'absorption en lumière infra-rouge	26
VII- Mesures de radioactivité	27
- Mesure de radioactivité par scintillation en	
milieu liquide	
VIII- Origine des produits utilisés	29
IX- Résumé	31

CHAPITRE II - ETUDE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE ET DU METABOLISME DE LA TESTOSTERONE	33
I- Milieu de culture sans testostérone	35
1°- Meilleures conditions de culture : recherche et résultat, rôle des glucides, rôle des protides, rôle du pH, rôle de la force ionique	
2°- Discussion	40
II- Milieu de culture avec testostérone	41
1°- Conditions de culture en présence de testostérone	41
A- absence de stérol contaminant	41
B- solubilisation de la plus grande quantité possible de stérol	41
C- production d'une masse bactérienne riche en 3 α -enzyme	42
D- conclusion	42
2°- Evolution de la testostérone	43
A- produits isolés à partir d'une culture réalisée en présence de testostérone	43
B- cinétique d'apparition des dérivés de la testostérone	48
III- Résumé	48
CHAPITRE III - ARGUMENTS EN FAVEUR DE LA NATURE REELLEMENT INDUITE DU 3 α -HYDROXYSTEROIDE : NAD-OXYDOREDUCTASE	53
I- Synthèse d'enzyme en l'absence de testostérone; synthèse d'enzyme en présence de testostérone et de chloramphénicol	55
A- Culture en l'absence d'inducteur	55
B- Culture en présence de testostérone et de chloramphénicol	55
II- Synthèse d'enzyme en présence de testostérone, par des bactéries dont les protéines sont marquées au préalable par le soufre S35	57
A- Marquage des protéines bactériennes	58
a- choix de l'élément radioactif	
b- détermination de la quantité de soufre à ajouter au milieu de culture et marquage des protéines bactériennes	
B- Induction du 3 α -enzyme	58
C- Isolement de l'enzyme, des protéines bactériennes	59
D- Etape préliminaire	59
E- Première et deuxième étapes	60
F- Troisième étape	60
a- filtration sur gel de dextrane	60
b- électrophorèse en veine liquide	61
G- Discussion des résultats	63
a- concernant la purification de l'enzyme	63
b- concernant le marquage radioactif de la protéine enzymatique	64
III- Résumé	66

CHAPITRE IV - STRUCTURES ET FONCTIONS INDISPENSABLES A LA MANIFESTATION	
DE L'EFFET INDUCTEUR	69
I- Conditions de culture	70
A- pureté du stéroïde	
B- concentration suffisante	
C- concentration constante	
D- mesure de concentration	
II- Etude des rapports stéroïde-bactéries	74
III- Résultats	74
A- action du stéroïde sur la croissance	
B- action du stéroïde sur l'apparition de l'enzyme 3 α	
a- comparaison de l'effet inducteur 6 heures	
après le contact avec le stéroïde	
- effet des métabolites de la testostérone	
- stéroïdes dérivés du noyau 5 α -androstane	
- influence du méthyle en C ₁₉	
- influence de la saturation du noyau A	
- influence d'une fonction oxygénée en C ₃	
- précisions supplémentaires	
- influence d'une fonction oxygénée sur le cycle D	
- influence d'un groupement méthyle en C ₂₀	
- rôle de la conformation	
- conclusions	
b- cinétique d'apparition de l'enzyme	84
C- action de la bactérie sur le stéroïde	85
IV- Discussion des résultats	86
V- Résumé	88
CHAPITRE V - TEMPS DE LATENCE D'APPARITION DE L'ENZYME 3 α -HYDROXYSTEROIDE :	
NAD-OXYDOREDUCTASE - ROLE DE DIFFERENTS FACTEURS	89
I- Réalité du temps de latence d'apparition de l'enzyme;	
hypothèses sur l'origine de ce retard	90
II- Influence de la composition des extraits enzymatiques et	
de la méthode de dosage de l'enzyme	92
A- consommation de l'enzyme	
B- inhibition de l'activité de l'enzyme	
C- sensibilité insuffisante de la méthode	
III- Influence de la nature de l'inducteur : faible solubilité	
du stéroïde	93
A- évolution de la concentration en présence d'un excès	
de testostérone	
B- influence de la concentration en testostérone	
C- " du tween 80	
D- " des protéines	
E- " d'un phosphate de stérol	
IV- Rôle de la pénétration de la testostérone	100
1°- Pénétration passive	100
A- Etude de l'incorporation de la testostérone par	
une culture en phase exponentielle	101
a- conditions expérimentales	
b- résultats	
c- interprétations	

B- Dosage de la testostérone intracellulaire	103
a- conditions expérimentales	
b- résultats	
2°- Pénétration active de la testostérone par un système de perméation	103
a- préparation de bactéries non induites et induites	
b- mise en contact avec la testostérone	
c- étude de l'incorporation	
d- résultats et interprétations	
3°- Conclusions	107
V- <i>La testostérone est-elle inductrice ?</i>	107
1°- <i>La testostérone est-elle inhibitrice ?</i>	108
2°- <i>La testostérone est-elle le véritable inducteur ?</i>	108
VI- <i>Conclusions</i>	116
VII- <i>Résumé</i>	117
 CHAPITRE VI - TEMPS DE LATENCE D'APPARITION DE L'ENZYME 3 α -HYDROXYSTEROIDE : NAD-OXYDOREDUCTASE - INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE.	119
I- <i>Rôle du glucose</i>	120
II- <i>Rôle de l'hydrolysate de caséine</i>	120
1°- <i>Mise en évidence de ce rôle</i>	
2°- <i>Détermination de la composition en acides aminés</i>	
III- <i>Rôle des acides aminés sur la production d'enzyme</i>	123
<i>Culture en présence de deux groupes d'acides aminés et d'un seul acide aminé.</i>	
IV- <i>Rôle des acides aminés sur la production d'enzyme et sur la croissance</i>	125
1°- <i>Culture en présence de deux groupes d'acides aminés</i>	125
2°- <i>Culture en présence d'un seul acide aminé</i>	125
A- <i>acide aminé métabolisé</i>	127
B- <i>acide aminé non métabolisé</i>	127
V- <i>Rôle d'un milieu incapable d'assurer la multiplication bactérienne</i>	127
VI- <i>Interprétation de ces faits</i>	131
1°- <i>Ce n'est pas la régulation de l'activité de l'enzyme</i>	133
<i>Incubation d'extrait enzymatique :</i>	
A- <i>avec des extraits de culture jeune</i>	
B- <i>avec différents acides aminés</i>	
C- <i>incubation de bactéries avec de l'hydrolysate de caséine</i>	
2°- <i>Répression de type catabolique</i>	134
VII- <i>Résumé</i>	136
 RESUME ET CONCLUSIONS SUR NOS RESULTATS	138

I N T R O D U C T I O N

L'étude de la dégradation microbiologique des stéroïdes n'est pas un fait nouveau, mais elle a été essentiellement conditionnée, certes, par la découverte, mais surtout par l'intérêt que l'on a porté à ces structures. Les recherches peuvent être, un peu schématiquement, groupées en quatre étapes :

Dans la première période, qui débute en 1913, le cholestérol constitue le seul substrat utilisé. L'allemand SOEHNGEN constate, en effet, que des Mycobactéries dégradant les paraffines, peuvent également utiliser le cholestérol comme seule source de carbone. En 1926, HAAG, puis plus tard TAK en 1942 et TURFITT en 1944 répètent sensiblement les mêmes expériences avec d'autres espèces de Mycobactéries. Les bactéries utilisées sont trouvées dans le sol qui apparaît comme la source de micro-organismes porteurs d'activités enzymatiques les plus diverses, permettant la dégradation de substances multiples.

La seconde étape est ouverte par MAMOLI et VERCELLONE en 1937, qui effectuent la dégradation microbiologique de structures dérivées du noyau 5 α -androstane. Ces deux auteurs, en se référant aux études de réduction phyto-chimique de NEUBERG, oxydent le 17 β -hydroxy, 3-oxo, androsta, 4-ène (testostérone) par un mélange de levures, de corynebactéries et de flavobactéries. ERCOLI et ARNAUDI réalisent également de très nombreux travaux entre 1938 et 1944 sur des structures analogues. Durant cette période les études sur le cholestérol se précisent. Ainsi HORVATH et KRAMLI (1947) obtiennent la cholesténone en utilisant soit *Proactinomyces roseus*, soit *Azotobacter sp.*

La troisième étape commence avec les études sur le noyau prégénane et le rapport de PETERSON et MURRAY en 1952, concernant l'hydroxylation en α sur le carbone 11 de la progestérone, en utilisant *Rhizopus arrhizus*. Ces auteurs précisent clairement le but de leur travail : "Il est bien connu que les plus grandes difficultés dans la synthèse partielle des stéroïdes résident dans l'introduction d'un oxygène en C₁₁. Or nous rapportons l'oxygénation d'un stéroïde, la progestérone en C₁₁, en une seule étape,

au moyen d'un champignon connu, de l'ordre des Mucorales (*Rhizopus arrhizus*)". Un nombre considérable de travaux ayant des buts analogues sera effectué dans les années qui suivent.

La quatrième étape est amorcée par TALALAY et DOBSON en 1953, qui donnent la purification et les propriétés de la β -hydroxystéroïde deshydrogénase de *Pseudomonas testosteroni*. HUBENER et LEHMAN, en 1958, rapportent la purification de la 20 β -hydroxystéroïde deshydrogénase de *Streptomyces hydrogenans*. SIH et BENNETT, en 1962, étudient avec soin la Δ^1 -deshydrogénase de *Nocardia restrictus*. On voit que ces auteurs s'intéressent non seulement aux réactions effectuées par les micro-organismes, mais recherchent les enzymes responsables de ces processus (TALALAY, 1957 - HURLOCK, 1957). Cependant le nombre de ces études reste faible par rapport aux quelques 500 travaux originaux que l'on a relevés depuis 15 ans.

Une partie des recherches fondamentales s'oriente vers les inter-réactions entre hydroxystéroïde-deshydrogénase et nicotinamide adénine nucléotide (HURLOCK, 1958 - STEIN, 1959); alors qu'une autre tend à élucider *comment* les enzymes apparaissent. Mais en 1963 deux auteurs seulement, à notre connaissance, s'intéressent à ce problème (NESEMAN, 1960 - SIH, 1962) bien que la plupart pensent qu'il s'agit de protéine induite.

Dans de telles conditions il nous a semblé intéressant d'étudier certains aspects du problème de l'induction chez une bactérie dégradant les stérols.

Nous avons choisi un *Pseudomonas* ayant la propriété non seulement de métaboliser la testostérone, mais aussi d'utiliser ce substrat comme seule source de carbone (TALALAY, 1952), d'où le nom de *Pseudomonas testosteroni* qui lui fut donné (MARCUS et TALALAY, 1956).

Lorsqu'on met en contact cette bactérie avec la testostérone, on constate deux ordres de faits :

- 1'. - La testostérone (17 β -hydroxy, 3-oxo, androsta, 4-ène) est transformée en différents dérivés sur lesquels nous reviendrons, pour finalement être dégradée en gaz carbonique et en eau.
- 2'. - La testostérone fait apparaître un certain nombre d'enzymes intervenant dans le métabolisme des stérols; six ont été reconnus jusqu'à présent :

- 3 (ou 17) β -hydroxystéroïde : NAD-oxydo-réductase . EC 1.1.1.51
TALALAY, DOBSON (1953)

- 3 α -hydroxystéroïde : NAD-oxydo-réductase EC 1.1.1.50
TALALAY, MARCUS (1954); MARCUS, TALALAY (1955)
- Δ^5 -3-cétostéroïde-isomérase
TALALAY, WANG (1955)
- Δ^1 -stéroïde-deshydrogénase,
- Δ^4 -5 α et Δ^4 -5 β -stéroïde-deshydrogénases
LEVY, TALALAY (1957 et 1959a).

Nous avons choisi d'étudier, en 1963, un de ces enzymes : le 3 α -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase, pour trois raisons; cette protéine était partiellement purifiée, elle possédait une spécificité d'action stricte sur les hydroxyles orientés en 3 α , enfin elle n'intervenait pas dans le métabolisme de la testostérone dépourvue de cette fonction : ce stérol pouvait être considéré comme un inducteur gratuit. Les autres enzymes étaient isolés moins parfaitement (Δ -deshydrogénases), ou avaient une activité moins spécifique (3 ou 17 β -enzyme) ou enfin étaient plus délicats à doser (isomérase).

La bactérie, le substrat et l'enzyme une fois choisis, il nous a semblé intéressant de préciser deux points, après avoir étudié les conditions de croissance de *Ps. testosteroni* et confirmé la nature réellement induite de l'enzyme.

Quelles sont les conformations et les configurations indispensables à la manifestation de l'effet inducteur et quels sont les groupements communs à ces différentes structures ? En d'autres termes, la spécificité de l'induction est-elle liée à quelques fonctions ou est-elle plus large ? Cette étude est facilement réalisable étant donné que l'on dispose avec les stérols de très nombreux isomères.

Le deuxième point a résulté des études de cinétique d'apparition de l'enzyme que nous avons effectuées aussi bien avec la testostérone qu'avec d'autres structures : nous avons toujours noté un temps de latence de plusieurs heures entre le moment où l'on ajoute l'inducteur et celui où apparaît l'enzyme. La recherche de l'origine de ce temps de latence qui n'a fait l'objet d'aucun travail dans le domaine de la dégradation microbiologique de stérols, sera donc développée.

o
o o

C H A P I T R E I

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

I. C U L T U R E D E S B A C T E R I E S

Après avoir précisé les caractères de *Pseudomonas testosteroni*, nous décrirons les différents milieux de culture, les techniques utilisées pour induire le 3 α -enzyme et nous rappellerons les moyens employés pour suivre la croissance bactérienne.

1°- SOUCHE BACTERIENNE.

Il s'agit d'un *Pseudomonas* non porteur de pigment fluorescent capable, on l'a vu, d'utiliser la testostérone comme seule source de carbone, d'où le nom de *Pseudomonas testosteroni* (ATCC 11996) qui lui fut donné (TALALAY, 1952). Lorsque nous avons entrepris ce travail il n'était fait aucune mention des aptitudes métaboliques de cette bactérie, ni des caractères biochimiques permettant de l'individualiser, si ce n'est la dégradation de certains stérols.

a)- Les caractères morphologiques sont ceux d'un *Pseudomonas*. La bactérie, dont les dimensions sont de 0,5-1 $\times$ 2-3 μ (figure 1), est seule, par paire ou par courte chaîne; elle est mobile par un ou deux flagelles polaires, et ne prend pas la coloration de Gram.

b)- La culture sur milieu ordinaire est formée de colonies de type S. Nous n'avons pas mis en évidence de pigment sur le milieu bouillon glucosé-sérum coagulé, ni sur les milieux de KING A et KING B. Par contre, après 48 heures, la culture sur pomme de terre glycinée devient saumon clair (figure 2), cette couleur s'accroissant dans les jours qui suivent. Cette même pigmentation est retrouvée sur milieu liquide contenant de l'extrait de levure ou de l'hydrolysate de caséine.

c)- Le type respiratoire correspond à celui d'une bactérie aérobie stricte : la culture ne se développe qu'en surface d'une gélose VF non nitrée. Elle possède une oxydase, une nitrate-réductase, cette dernière activité donnant des nitrites, mais non la formation d'azote moléculaire. Nous n'avons pas mis en évidence de catalase.

d)- Le catabolisme glucidique est pauvre. Il a été recherché sur milieu de HUGH et LEIFSON (1953). En 48 heures le glucose, le lactose, le mannitol

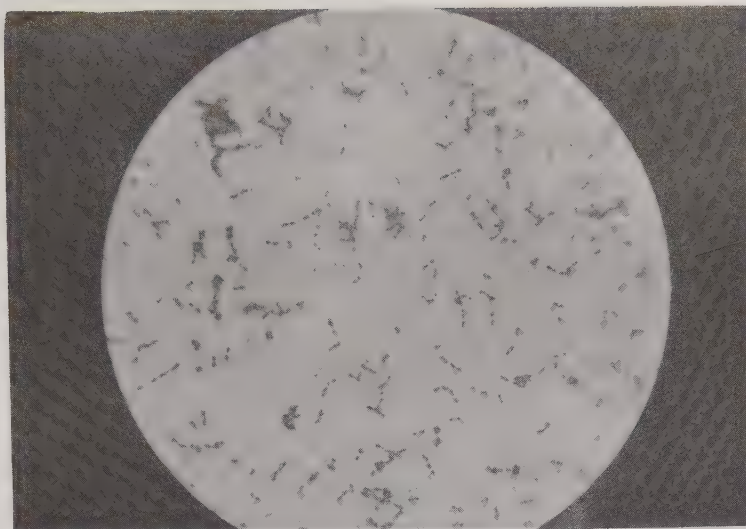


Figure 1



Figure 2

en particulier ne sont pas oxydés. Après plusieurs jours on note une légère oxydation du glucose. Le citrate de sodium peut être utilisé comme seule source de carbone (milieu de KOSER, SIMMONS).

e)- Le métabolisme protidique est également peu marqué. Les substrats tests classiques, l'urée, la lysine, l'arginine ne sont pas dégradés, le tryptophane n'est ni décarboxylé, ni désaminé. Il n'y a ni production d'hydrogène sulfuré, ni d'ammoniac. Les protides complexes ne sont pas attaqués (sérum, hématies, lait).

Enfin nous n'avons pas observé de différence entre des souches cultivées ou non, en présence de testostérone.

f)- Ces aptitudes métaboliques ont été complétées par HUGH (1965). De leur analyse et de l'étude du rapport guanine/cytosine cet auteur pense que *Pseudomonas testosteroni* peut être rapproché de *Vibrio terrigena* (GÜNTHER, 1894). De fait, l'identification du genre peut prêter à discussion, mais le caractère particulier de la dégradation de structures cycliques confère, jusqu'à ce jour, une certaine individualité à cette bactérie. TALALAY (1952) a signalé l'oxydation par ce microorganisme de stéroïdes en C₁₉ (tableau 1) alors que des stéroïdes en C₂₀ avec un groupement méthyle en C₁₇ ("méthyle testostérone") ne sont pas dégradés.

Il en est de même des stéroïdes en C₁₈ de la série oestrane et en C₂₁ de la série du prégénane (stéroïdes cortico-surrénaliens) qui ne sont pas métabolisés par cette bactérie.

En 1964 JACOBSON a montré que *Pseudomonas testosteroni* peut également utiliser le camphre comme seule source de carbone. Ces faits seront repris plus loin.

TABLEAU 1

STEROLS OXYDES PAR LA CELLULE DE *PSEUDOMONAS TESTOSTERONI*

3,17-dioxo, 5 α -androstane,
3,17-dioxo, 5 α -androsta, 4-ène,
17 β -hydroxy, 3-oxo, 5 α -androsta, 4-ène (testostérone),
17 α -hydroxy, 3-oxo, 5 α -androsta, 4-ène (17 épitestostérone),
3 β -hydroxy, 17-oxo, 5 α -androstane (épiandrostérone),
3 β -hydroxy, 17-oxo, 5 α -androsta, 5-ène (déhydroépiandrostérone),
3 α -hydroxy, 17-oxo, 5 α -androsta, 5-6-ène (déhydroandrostérone).

g)- Température d'incubation : en milieu aéré la température de 30° permet la croissance la plus importante. A 37° la culture est peu abondante. A 0°, 10°, 45°, elle est nulle après 3 jours d'incubation.

2*- MILIEUX DE CULTURE.

Différents milieux sont utilisés suivant le but que l'on se propose. Mais presque tous sont constitués d'une solution de base à laquelle différents substrats sont ajoutés.

A)- Milieu d'entretien : bouillon de viande gélosé à 2%.

B)- Milieu de base formé à partir de 2 ou de 3 solutions suivantes :

Solution de base :

phosphate monoammonique	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$	1,00 g
phosphate biammonique	$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	1,00 g
phosphate monopotassique	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	2,00 g
solution d'éléments		10 ml
eau tridistillée	qsp	1.000 ml

Solution d'éléments :

sulfate de magnésium	$\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$	20,00 g
chlorure de sodium	ClNa	1,00 g
sulfate ferreux	$\text{SO}_4\text{Fe}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,50 g
sulfate de zinc	$\text{SO}_4\text{Zn}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,50 g
sulfate de manganèse	$\text{SO}_4\text{Mn}, 1\text{H}_2\text{O}$	0,41 g
sulfate de cuivre	$\text{SO}_4\text{Cu}, 5\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
acide sulfurique	SO_4H_2 0,1N	10 ml
eau distillée	qsp	1.000 ml

Solution de vitamines :

thiamine	4 mg
riboflavine	20 mg
panthoténate de calcium	8 mg
pyridoxine	24 mg
biotine	8 mg
amide nicotinique	12 mg
eau tridistillée	1.000 ml
conservation à 0° pendant 15 jours.	

C)- Milieux de culture :

milieu au lactate de sodium (L) :

D-lactate de sodium	5,00 g
solution de base	1.000 ml

milieu à l'acide succinique (S) :

acide succinique	8,00 g
solution de base	1.000 ml

milieu à l'hydrolysate de caséine et au glucose (G-HC) ou à l'acide succinique (S-HC) avec éventuellement addition de vitamines (G-HC-V) selon WACKER (1965) :

glucose ou acide succinique	8,00 g
hydrolysate de caséine	5,00 g
solution de vitamines	50 ml
solution de base	950 ml

milieu à l'hydrolysate de caséine (HC) :

hydrolysate de caséine	5,00 g
solution de base	1.000 ml

milieu à l'extrait de levure (EL) (DELIN, 1963). L'extrait employé est la fraction soluble dans l'eau, d'un autolysate de levure.

phosphate monoammonique	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$	1,00 g
phosphate biammonique	$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	1,00 g
phosphate monopotassique	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	2,00 g
sulfate de manganèse	$\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$	2 mg
extrait de levure		10 g
eau distillée		1.000 ml

milieu avec la cystéine comme seule source de soufre (milieu C).

On remplace les 27,9 mg par litre de soufre du milieu S par 3,6 mg apportés sous forme de cystéine.

acide succinique		5,000 g
hydrochlorhydrate de cystéine		0,020 g
phosphate monoammonique	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$	1,000 g
phosphate biammonique	$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	1,000 g
phosphate monopotassique	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	2,000 g
chlorure de magnésium	$\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	165 mg
chlorure de fer	Cl_3Fe	2 mg
chlorure de sodium	ClNa	10 mg
chlorure de zinc	Cl_2Zn	2 mg
chlorure de manganèse	Cl_2Mn	2 mg
acétate de cuivre	$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$	0,5 mg

Le pH de tous ces milieux est ajusté à 7,0. La stérilisation est effectuée par filtration sur membrane SEITZ EKS/2.

3°- TECHNIQUES DE CULTURE ET D'INDUCTION.

D'après les caractères physiologiques rapportés au paragraphe 1, la culture en milieu liquide est effectuée en aérobiose, obtenue par agitation mécanique (amplitude 20 cm, fréquence 60 par minute) dans un bain-marie à $30^\circ \pm 0,5^\circ \text{ C}$.

La culture sur milieu d'entretien est repiquée toutes les 3 semaines. Elle sert à ensemer le milieu liquide de départ dont la composition est la même que celle du milieu où aura lieu l'induction. La croissance effectuée, les bactéries en phase stationnaire sont ensemencées dans un second milieu où se développe une culture qui, lorsqu'elle est en phase exponentielle, sert elle-même d'inoculum pour un troisième milieu où s'effectue l'induction. Ces repiquages successifs permettent d'adapter *Pseudomonas testosteroni* aux nouvelles substances nutritives, d'obtenir une masse suffisante de bactéries et, enfin, d'éviter une phase de latence dans le développement de la troisième culture.

L'induction du 3 α -enzyme est réalisée dans cette dernière culture en ajoutant au temps zéro, en même temps que l'inoculum, le stéroïde à l'état pulvérulent. L'inducteur doit être entièrement soluble : la quantité maximum pouvant se dissoudre est en général de l'ordre de 3.10^{-4} M. Dans certains cas, on est amené à favoriser cette solubilisation par autoclavage du milieu non ensemencé à 100° pendant 10 minutes ou par chauffage à 60° pendant 12 heures, ou enfin par addition de sérum-albumine de boeuf (6g par litre de milieu), cette substance permettant par ailleurs une bonne croissance microbienne. Des quantités de testostérone 5 fois plus importantes (15.10^{-4} M) sont parfois ajoutées. La dispersion dans le milieu de culture est alors obtenue par action des ultra-sons dans un volume de 10 ml. On a vérifié que le stéroïde n'est pas modifié par ce traitement. Enfin, on n'a pas eu à incorporer de substance antimousse.

4-- MOYENS D'ETUDE DE LA CROISSANCE MICROBIENNE.

Nous avons utilisé la mesure à 650 m μ de la densité optique des suspensions bactériennes dans le milieu de culture avec un témoin "milieu non ensemencé" (spectrophotomètre Jean et Constant, tare 58,5). Les mesures ont été répétées toutes les 20 minutes, chaque fois que cela était possible.

Dans le cas où la quantité de stéroïde dépasse la limite supérieure de solubilité, on laisse se déposer l'excès insoluble pendant 5 minutes avant d'effectuer la mesure.

Une correspondance a été établie entre les unités de densité optique et le poids sec d'une quantité déterminée de culture bactérienne.

II. OBTENTION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE.

L'activité enzymatique n'est retrouvée qu'à l'intérieur des cellules. Il est donc nécessaire d'isoler les bactéries et ensuite de libérer l'enzyme. L'espace de temps séparant le prélèvement du dosage enzymatique entache d'erreur les études de cinétique d'apparition de l'enzyme. On a donc ajouté systématiquement à chaque prélèvement du chloramphénicol comme inhibiteur des synthèses protéiques. Pour des cultures de densité optique de départ comprise entre 0,02 et 2,70, on a montré que la concentration de 50 µg/ml était suffisante pour inhiber la multiplication bactérienne.

1°- SEPARATION DES BACTERIES.

Parmi les constituants du milieu de culture, il est nécessaire d'abord d'éliminer le stérol ajouté comme inducteur.

a)- On a vu que la quantité de stérol est telle qu'elle est totalement soluble dans le milieu de culture. Dans certaines expériences cependant, on a incorporé des quantités dépassant la limite supérieure de la solubilité. Aussi avant de séparer les bactéries, on élimine cette fraction particulière par centrifugation très modérée (30g, 2 minutes) le surnageant contenant toutes les bactéries.

b)- La séparation des bactéries des autres constituants du milieu de culture est effectuée par centrifugation à 22.000 g pendant 10 minutes à + 2° (SORVALL RC. 2). Le culot de bactéries obtenu est remis en suspension en tampon phosphate monopotassique et disodique de SØRENSEN (0,03 M pH 7,2), puis l'ensemble est centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Deux lavages sont ainsi réalisés successivement. La troisième suspension est faite dans le tampon d'extraction. La densité optique (à 650 mµ) est ajustée à 2. Dans le cas d'expériences comparatives et où la densité finale des suspensions était inférieure à cette valeur, elle a été ajustée sur la valeur la plus faible.

2°- DISRUPTION DES BACTERIES.

La technique de modification de la perméabilité de la cellule d'*Escherichia coli* par le toluène, permettant le dosage d'enzyme endocellulaire

telle que la β -galactosidase (COHN, 1951), ne s'est pas révélée efficace pour le 3α -enzyme de *Pseudomonas testosteroni*. Deux méthodes de disruption ont été surtout utilisées (action des sons et action des ultra-sons), l'action des fortes pressions n'étant employée que pour démontrer la nature soluble de l'enzyme.

a)- L'utilisation des sons, obtenus par magnétostriction (appareil Raythéon) est bien connue en enzymologie bactérienne. MARCUS (1956), a constaté que le 3α -enzyme était stable pendant 15 minutes à la fréquence de 10 Kcycles de l'appareil (température maintenue à 10°). Nous avons réduit ce temps à 10 minutes dans les mêmes conditions et noté une excellente reproductibilité des résultats.

b)- L'utilisation des ultra-sons est moins répandue en raison principalement de leur action dénaturante sur les protéines enzymatiques. Nous avons employé l'appareil SONIFIER-BRANSON S 125, produisant par effet piézo-électrique des ultra-sons de fréquence 20 Kcycles. La production de chaleur est assez importante, malgré une conversion énergétique à rendement de 93%, si l'on ne prend pas quelques précautions. Les différents essais que nous avons effectués montrent que si le volume à traiter contenu dans un tube en verre pyrex plonge dans un bain d'eau et de glace en paillettes maintenu thermiquement homogène par un agitateur magnétique, la température n'augmente que de 10° (10 essais). Conditions utilisées : volume de 12 ml contenu dans un tube en verre pyrex de diamètre 20 mm (les tubes en nitrate de cellulose, plus résistants mais peu perméables aux échanges thermiques sont à éliminer); température initiale : + 2°; intensité de 4 ampères, pendant 5 minutes.

Les conditions d'extraction ainsi déterminées permettent d'obtenir un extrait d'activité enzymatique identique à celui obtenu avec l'appareil Raythéon.

c)- La disruption bactérienne par haute pression (FRENCH press, FRENCH, 1955) est provoquée par le passage de la suspension cellulaire maintenue à une pression de 1.406 Kgf/cm² (20.000 psi) au travers d'une ouverture de faible diamètre (1,5 mm). Il est à noter que pour une suspension bactérienne de départ à 0°, contenue dans la cellule elle-même à 0°, l'élévation de température de l'homogénat est de 15°.

III. DOSAGE ENZYMATIQUE

L'enzyme 3 α -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase EC 1.1.1.50 (3 α -enzyme) ^{oxyde} réduit la fonction 3 α -hydroxyle des stéroïdes en 3 cétone, en utilisant le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD⁺) comme seul accepteur d'hydrogène (MARCUS, 1956).



La mesure de l'activité de cet enzyme se fera donc par mesure de la quantité de NAD réduit pendant l'unité de temps, au maximum d'absorption du NADH (340 m μ).

1° - DETERMINATION DES MEILLEURES CONDITIONS DE DOSAGE.

La spécificité de la réaction de déshydrogénation citée plus haut ne fait aucun doute, puisque TALALAY (1956-1959) a montré qu'un mélange des deux isomères AB trans 3 α , 17 β -dihydroxy, 5 α -androstande et 3 β , 17 α -dihydroxy, 5 α -androstande mis en présence de 3 α -enzyme donnait quantitativement le 17 β -hydroxy, 3-oxo, 5 α -androstande, le deuxième isomère restant inchangé. Une configuration AB trans est plus favorable que AB cis.

Pour nous assurer d'une bonne reproductibilité des résultats, les différents facteurs de la réaction enzymatique : substrat, coenzyme, extrait enzymatique vont être étudiés et les conditions de pH et de température fixées.

A. - Recherche du pH optimum et des concentrations ioniques optimales.

Puisque les ions hydrogène participent à la réaction :



le pH du milieu où s'effectue cette réaction agit sur l'équilibre. MARCUS (1956) a montré que dans les conditions de stabilité de l'enzyme 3 α , le pH optimum se situe entre 9,8 et 10,0 en utilisant le pyrophosphate de sodium P₂O₇Na₄10H₂O.

L'étude de l'influence de la concentration en pyrophosphate, toutes choses égales par ailleurs, nous a indiqué une vitesse initiale maximum pour une molarité de 66,6 μ M, valeur qui sera adoptée dans la méthode de dosage.

Dans ces conditions il convient que les autres éléments participant à la réaction n'apportent pas de variation de pH. C'est pour cela que la solution de NAD^+ en eau tridistillée, telle que nous l'employons et dont le pH est de 3,1 est amenée à un pH voisin de 8,3 par addition de carbonate acide de sodium. De même, le tampon phosphate monopotassique et disodique (pH 7,2) dans lequel est réalisé l'extrait bactérien ne doit pas être à une molarité trop forte. Après une étude systématique, nous avons adopté la molarité de 0,003 M pour laquelle l'addition d'un tel tampon ne donne pas d'abaissement de pH appréciable. Nous avons enfin vérifié que le pH initial de 10,0 reste inchangé après la réaction (pH mètre Polymétron type 45 B Zurich).

B.- Température à laquelle s'effectue l'oxydation.

Les solutions des différents éléments de la réaction sont incubées à 25° avant leur mélange.

C.- Substrat.

Nous avons utilisé le 3 α -hydroxy, 17-oxo, 5 α -androstane (androstérone MARCUS, 1956).

a)- Concentration : il est important de se trouver dans une zone de concentration telle que la vitesse initiale d'oxydation du stérol soit indépendante de faible variation de la quantité de stérol. Cette vitesse, comme l'a montré TALALAY, dépend de la concentration en substrat jusqu'à 9 $\mu\text{g/ml}$. Pour des concentrations supérieures (jusqu'à 20 $\mu\text{g/ml}$) elle reste la même : il n'y a pas d'inhibition par excès de substrat.

La concentration choisie est de 10 $\mu\text{g/ml}$ (0,066 $\mu\text{M}/\text{ml}$).

b)- Solubilisation du stérol : nous n'avons pas employé l'éthanol ni le méthanol (MARCUS, 1955), les extraits bactériens des *Pseudomonas* étant riches habituellement en activité déshydrogénasique pour ces solvants. Le dioxane distillé et conservé à +2° a été seul utilisé. Le stérol solubilisé ajouté à la solution aqueuse contenue dans la cuve ne re-précipite pas; la densité optique de la solution reste inchangée. On a toujours effectué une réaction témoin contenant tous les éléments de la réaction (solvant du stérol compris) sauf le substrat.

D.- Nicotinamide=adénine=dinucléotide (NAD^+) - rôle de la concentration.

Il est généralement admis que l'on peut ajouter un excès de NAD^+ correspondant à une densité optique de 2 si ce produit est entièrement réduit en NADH.

La mesure de l'activité enzymatique à différentes concentrations de NAD^+ (figure 3) montre qu'il n'est pas indifférent d'ajouter des quantités supérieures à $0,50 \mu\text{Mole/ml}$ de solution. Pour un même extrait, l'activité enzymatique avec une concentration de $0,90 \mu\text{Mole/ml}$ est de 20% inférieure à celle obtenue avec une concentration de $0,35 \mu\text{Mole/ml}$. Ce résultat n'est pas dû à la dénaturation du NAD^+ à la température ambiante, puisque la même courbe est obtenue quand on réalise les mesures en commençant par les plus fortes concentrations. Il provient de l'abaissement de pH résultant de l'incorporation de quantité croissante de NAD^+ dont le pH est voisin de 8,3. La concentration finalement retenue est de $0,37 \mu\text{Mole/ml}$. Au cours de la réaction enzymatique un dixième de cette quantité est réduite.

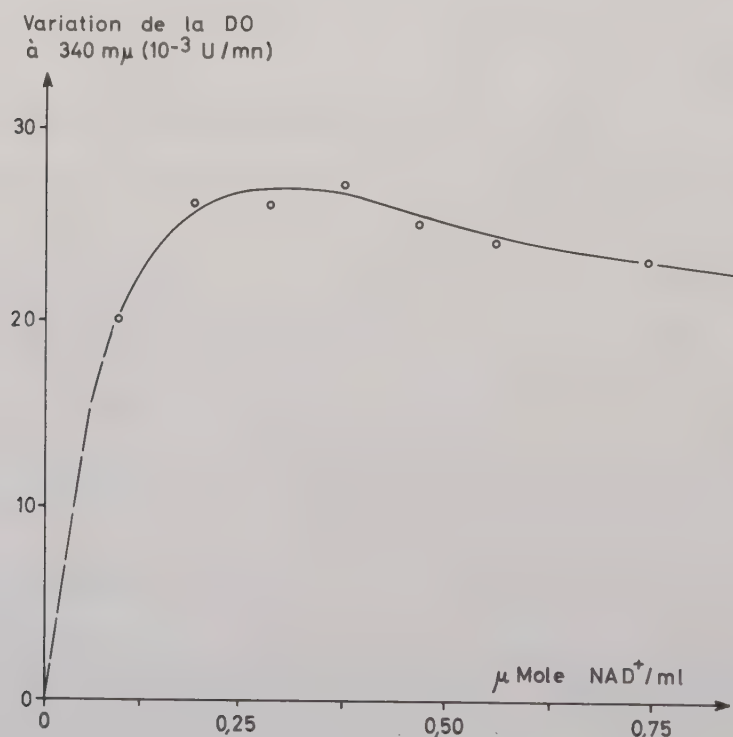


FIGURE 3

E.- Extraits enzymatiques :

- a)- Tampon de suspension de l'extrait. Il a déjà été précisé que la solution employée est un tampon de phosphate de sodium et de potassium 0,003 M, pH 7,2.
- b)- Le volume de l'extrait enzymatique est compris en général entre 2,5 et 5% du volume final de la réaction; il contient 0,1 à 0,2 mg de pro-

téine. On complète à un volume constant par addition de tampon phosphate de sodium et de potassium 0,003 M, pH 7,2.

Pour détecter de très faibles quantités d'enzyme on a été amené à ajouter jusqu'à 37,5% du volume final de la réaction. La présence de concentration importante de protéine non enzymatique n'a pas d'influence sur l'activité enzymatique mesurée.

- c)- La quantité d'extrait choisie est telle que la vitesse initiale de la réaction est proportionnelle à la concentration de l'enzyme (figure 4). C'est ainsi qu'avec l'extrait X_8 qui a servi à établir la droite de la figure 4 un volume de 50 μ l permet d'effectuer une mesure valable.

Variation de la DO
à 340 m μ (10^{-3} U/mn)

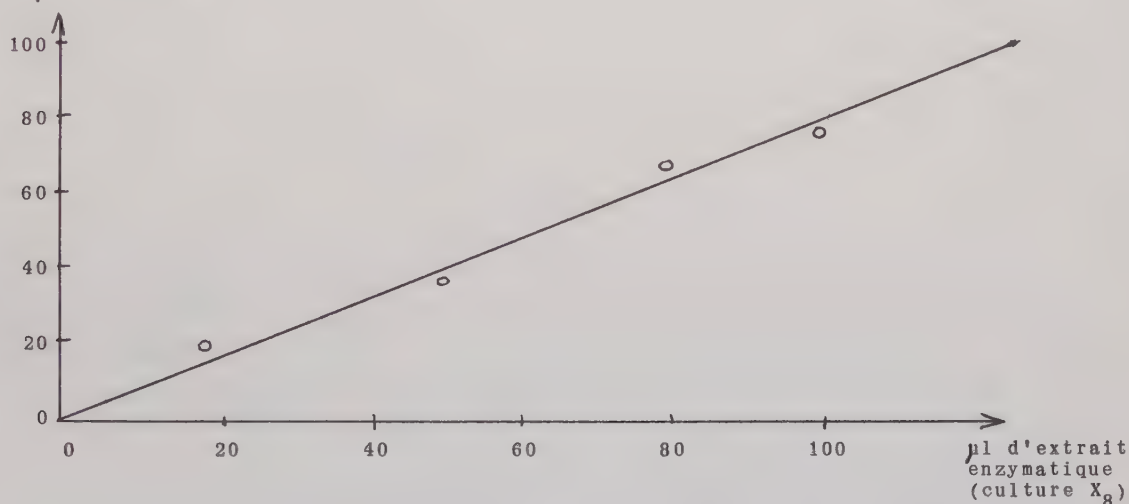


FIGURE 4

- d)- L'addition de chélateur de cations lourds (sel disodique de l'acide éthylène-diamine-tétraacétique : EDTA; sel dipotassique et monomagnésien de l'acide éthylène-diamine-tétraacétique : magnésium-titriplex) aux extraits bactériens bruts ne nous a pas donné d'augmentation de la valeur de l'activité enzymatique, l'enzyme étant stable en solution complexe. Par contre on a toujours ajouté de l'EDTA (0,001 M) aux extraits purifiés (cf. paragraphe suivant).

2°- REACTION ENZYMATIQUE.

A)- Exécution de la réaction :

Elle diffère de celle proposée par MARCUS (1956) ou par DELIN (1964) par la concentration des réactifs. Les différents éléments sont ajoutés

dans l'ordre et aux concentrations indiquées, dans une cuve de trajet optique 1 cm (spectrophotomètre JOBIN et YVON), le volume total de la solution étant de 2 ml. Nous n'avons pas effectué de préincubation en présence des trois premiers termes de la réaction.

Dans 2 ml :

pyrophosphate de sodium $P_2O_7Na_4 \cdot 10H_2O$	1 ml d'une solution	133,32 μM
en solution dans l'eau tridistillée	à 5,944 g pour 100ml	
3 α -hydroxy, 17-one, 5 α -androstan-3-one	20 μl d'une solution	0,066 μM
dissout dans le dioxane	à 10 mg dans 10 ml de dioxane	
NAD ⁺ en solution dans l'eau tridistillée, pH 8,3 par du bicarbonate de sodium.	250 μl d'une solution	0,754 μM
	à 20 mg dissout dans 10 ml.	

Solution enzymatique en tampon

phosphate de SØRENSEN 0,003 M, pH 7,2

complétée avec le même tampon à 750 μl 2,25 μM

B)- *Lecture et expression des résultats :*

La réaction débute avec l'addition de la solution enzymatique. La variation de la densité optique à 340 $m\mu$ est notée toutes les 15 secondes pendant 3 minutes au moins. La lecture est prolongée jusqu'à 10 minutes dans le cas d'activité enzymatique peu élevée. Chaque mesure est effectuée contre un blanc contenant tous les composés sauf l'androstérone.

L'activité enzymatique est calculée en se référant à la vitesse initiale. Une unité d'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme donnant une variation de densité optique de 10^{-3} unité par minute. L'activité enzymatique spécifique (AES) correspond à l'activité enzymatique rapportée au milligramme de protéine de l'extrait. Enfin une unité ainsi définie correspond à la transformation de $0,322 \cdot 10^{-3} \mu M$ de NAD⁺ (activité enzymatique spécifique en unité internationale AES-UI). Une courbe de dosage enzymatique est donnée dans la figure 5 : on voit que l'équilibre $NAD^+ + 2H \longrightarrow NADH + H^+$ est obtenu avec une quantité de NADH correspondant à une densité optique de 0,230 à 340 $m\mu$.

C)- *Dosage enzymatique d'extrait purifié :*

BOYER (1964) a constaté que le 3 α -enzyme subit une inactivation en solution très diluée alors que la sérum-albumine de boeuf (dépourvue d'ac-

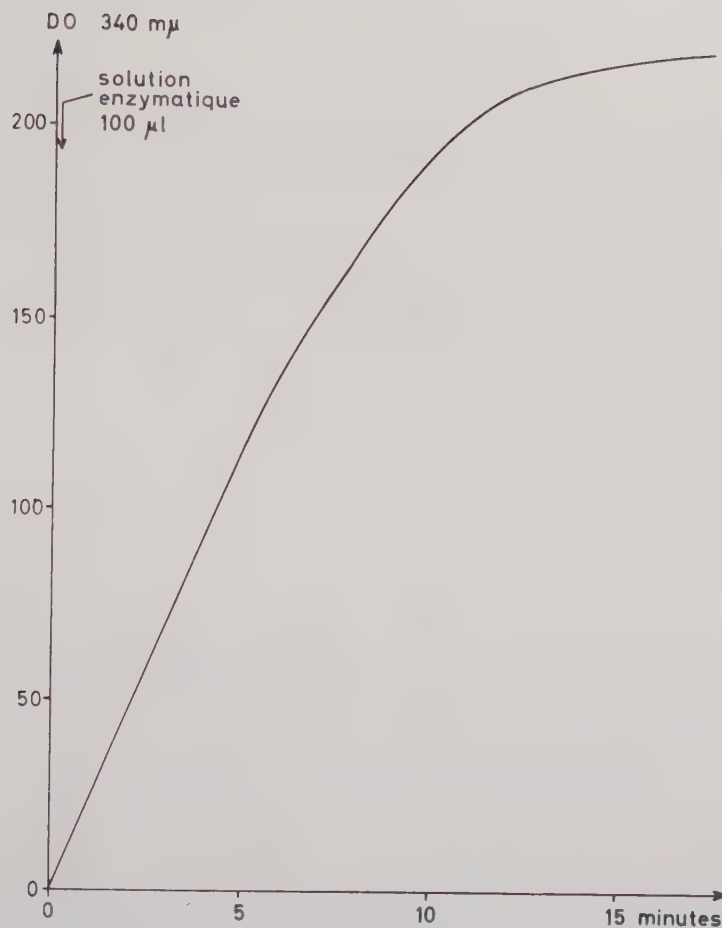


FIGURE 5

tivité hydroxystéroïde-déshydrogénasique mesurable) exerce un effet protecteur. Le NAD^+ ne posséderait pas cette propriété. Or la solution enzymatique est diluée de 10 à 20 fois quand on l'ajoute aux autres éléments de la réaction. Aussi pour éviter sa dénaturation BOYER ajoute 160 μg de sérum-albumine par ml de solution contenue dans la cuve de mesure. C'est cette concentration que nous avons utilisée pour doser l'activité enzymatique des fractions obtenues après électrophorèse.

IV. DOSAGE DES PROTEINES.

Trois méthodes ont été employées suivant la pureté et la concentration en protéine de l'extrait enzymatique.

La méthode du biuret, selon STICKLAND (1951) a été utilisée sur des extraits bruts. Trente minutes après l'addition de la solution alcaline tartrique de sulfate de cuivre, la densité optique est mesurée à 560 m μ contre un blanc contenant le tampon d'extraction de l'enzyme et le réactif. Deux concentrations doubles l'une de l'autre du même extrait sont testées pour s'assurer de la valeur du réactif que l'on ne conserve pas au-delà de 3 semaines. Une gamme de dilution de 0,2 à 1 mg de fraction V de bovalbumine réalisée dans le même tampon que celui de l'extrait enzymatique est utilisée comme standard.

La méthode au réactif de FOLIN, selon LOWRY (1951) n'a été employée que sur les fractions purifiées riches en activité enzymatique obtenues après filtration sur gel de Séphadex. La densité optique à 750 m μ est mesurée trente minutes exactement après l'addition du réactif de FOLIN, contre un mélange témoin sans protéine. La gamme de dilutions de la fraction V de bovalbumine s'étend de 10 à 75 μ g. Pour les fractions obtenues par électrophorèse en veine liquide en tampon TRIS-HCl : 0,025 M, EDTA 0,001 M pH 8,2, nous avons pu préciser que l'EDTA avait été éliminé en particulier des fractions contenant l'enzyme, par migration sous l'influence du champ électrique. Cette modification du tampon nous a permis lors du dosage d'éviter l'effet complexant de l'EDTA sur les cations du réactif de FOLIN, cause d'une erreur par défaut.

Enfin la méthode de KALCKAR (1947), méthode de mesure de l'absorption à 260 et 280 m μ n'a été utilisée que rarement. Le repérage des protéines dans les fractions obtenues après chromatographie ou électrophorèse est obtenu par mesure de l'absorption à 280 m μ .

V. PURIFICATION DE L'ENZYME

Elle a été entreprise uniquement dans le but de démontrer qu'en phase exponentielle, le 3~~x~~-enzyme se forme à partir d'acides aminés puisés à l'extérieur de la cellule.

Les différentes étapes de la purification sont les suivantes :

1°- PRECIPITATION DES ACIDES NUCLEIQUES PAR LE SULFATE DE STREPTOMYCINE.

On utilise une solution en eau tridistillée dans les proportions suivantes :

Sulfate de Streptomycine	400 mg
EDTA	20 mg
Eau tridistillée	10 ml
Bicarbonate de sodium	en quantité suffisante pour obtenir un pH de 7,0

La précipitation est effectuée dans les proportions de 2 parties de sulfate de streptomycine pour 5 parties de protéines (poids/poids) pendant 15 heures à +2°. Le culot obtenu par centrifugation à 7.000 g pendant 10 minutes, est écarté.

2°- PRECIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

On ajoute au surnageant obtenu précédemment et contenant 2% de protéine, du sulfate d'ammonium à l'état solide et réduit en poudre fine, pour éviter la dilution de la solution enzymatique. L'addition est réalisée très lentement, d'une manière continue, la solution enzymatique étant agitée modérément. La quantité W grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à la solution de volume V_1 pour élever la concentration de S_1 à S_2 est calculée d'après la règle de NODA (1957) :

$$W = \frac{0,515 V_1 (S_2 - S_1)}{1 - S_2 (0,272)}$$

Le précipité que l'on a laissé se former pendant 8 heures au moins à +2°, est recueilli par centrifugation à 20.000 g durant 20 minutes. Sa

dissolution est effectuée suivant BOYER (1964) dans le minimum de mélange A dont le pH est amené à 7,0.

Phosphate monopotassique	0.050 M
EDTA (sel disodique)	0,003 M
β -mercaptoéthanol	0,005 °/cc
Glycérol anhydre	2 °/cc

Le surnageant sert à une nouvelle précipitation.

3°- FILTRATION SUR GEL DE DEXTRANE (SEPHADEX G 100).

Les fractions riches en activité enzymatique obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium sont dialysées 18 heures à +2° contre le mélange tampon qui servira à la filtration.

Cette dernière a été effectuée sur colonne de gel de Séphadex G 100 (nous ne possédions alors qu'une colonne de 45 cm de long et 2,5 cm de diamètre) en tampon phosphate de potassium 0,0300 M (PO_4HK_2 0,0206 M, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,0094 M, pH 7,2). On recueille toutes les 5 minutes une fraction de 3 ml. Le volume mort de la colonne déterminé avec le bleu dextrane est de 80 ml. La température a été maintenue à + 4° durant toute la filtration.

4°- ELECTROPHORESE EN VEINE LIQUIDE. Appareil ELPHOR-VAP.

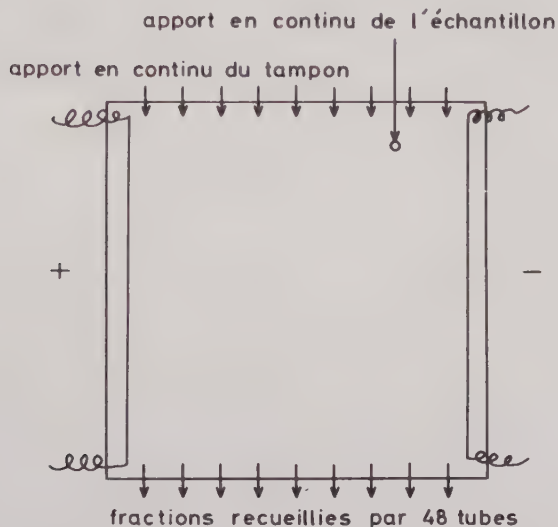
Les fractions précipitées par le sulfate d'ammonium et dissoutes dans le mélange A, sont dialysées une nuit à +2° dans le mélange B (pH 6,4).

EDTA	0,001 M
β -mercaptoéthanol	0,005 °/cc
Glycérol anhydre	2,5 °/cc

L'électrophorèse est effectuée dans les conditions données par DELIN et PORATH (1964) pour l'électrophorèse de zone sur colonne : tampon TRIS-HCl 0,025 M, EDTA 0,001 M, pH 8,2. Mais notre séparation n'est pas réalisée sur un support, mais dans un film liquide de 0,5 mm d'épaisseur. Elle est possible par l'action simultanée d'un courant descendant de tampon (120 ml par heure correspondant au volume total de la chambre) et d'un champ électrique de 2.500 volts avec une intensité effective de 114 mA perpendiculaire à l'axe d'écoulement du tampon (figure 6). La température est maintenue à +2° par un vigoureux refroidissement par air. Le point isoélectrique de l'enzyme étant donné comme égal à 6,1 (SQUIRE, 1964), après quelques essais préliminaires, l'échantillon a été déposé près du pôle négatif, au quart de la distance séparant pôle négatif et pôle posi-

tif. La concentration en protéine n'a jamais été supérieure à 2%; la vitesse de passage est de 1,5 ml/heure. La durée de la séparation, suivant le volume de l'échantillon, est de 3 à 7 heures.

SCHEMA DE L'APPAREIL ELPHOR-VAP



Le film liquide 50 x 50 x 0,05 cm dans lequel s'effectue l'électrophorèse est incliné de 45° sur l'horizontal, pour permettre l'écoulement du tampon sous l'action de la pesanteur.

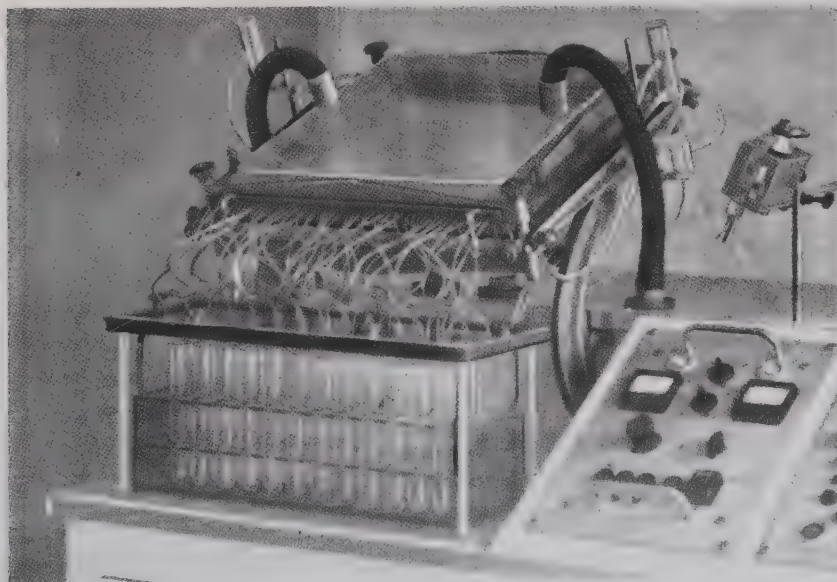


Figure 6

VI. ETUDE DES STEROIDES

Les stéroïdes, après extraction de la phase aqueuse où ils sont dissouts, sont identifiés par trois méthodes : chromatographie sur couche mince, mesures de l'absorption en lumière ultra-violette et en lumière infra-rouge.

1°- Extraction des stéroïdes.

L'extraction de la testostérone et de ses dérivés est réalisée avec un volume d'acétate d'éthyle égal au volume à traiter, en milieu acide (pH 2 avec de l'acide sulfurique) et en présence de chlorure de sodium 10%. Trois extractions successives avec chaque fois un volume neuf de solvant sont conduites en 3 heures. Les 3 extraits réunis sont lavés en milieu alcalin. Après déshydratation du solvant sur sulfate de sodium, on effectue l'évaporation à la température ambiante sous courant d'air.

L'extraction d'autres stéroïdes utilisés au cours des essais d'induction est effectuée avec de l'acétate d'éthyle ou du chloroforme en milieu neutre. Elle est réalisée en une seule fois pour les essais qualitatifs; la figure 7 montre qu'une deuxième extraction permet d'obtenir 5% de la quantité initialement isolée.

2°- Chromatographie sur couche de gel de silice.

A.- On a utilisé le Kieselgel GF₂₅₄ (87% de silice, 13% de sulfate de calcium) fluorescent à 254 mμ par addition d'un "produit inorganique". L'épaisseur de la couche de gel est de 0,25 mm (chromatographie sur couche mince). Le gel est activé par passage au four (1 heure à 140°). Après dépôt de 80 à 150 μg de stéroïdes, la migration est effectuée avec un mélange de solvants précisé dans chaque cas.

Les stéroïdes sont localisés par coloration. Cette dernière est obtenue par pulvérisation de la solution AN suivante :

acide acétique pur	50,0 ml
acide sulfurique pur	1,0 ml
anisaldéhyde	0,5 ml

et chauffage 10 minutes à 80°. L'identification des produits est basée sur leur R_F et l'appréciation de leur absorption en lumière ultra-violette

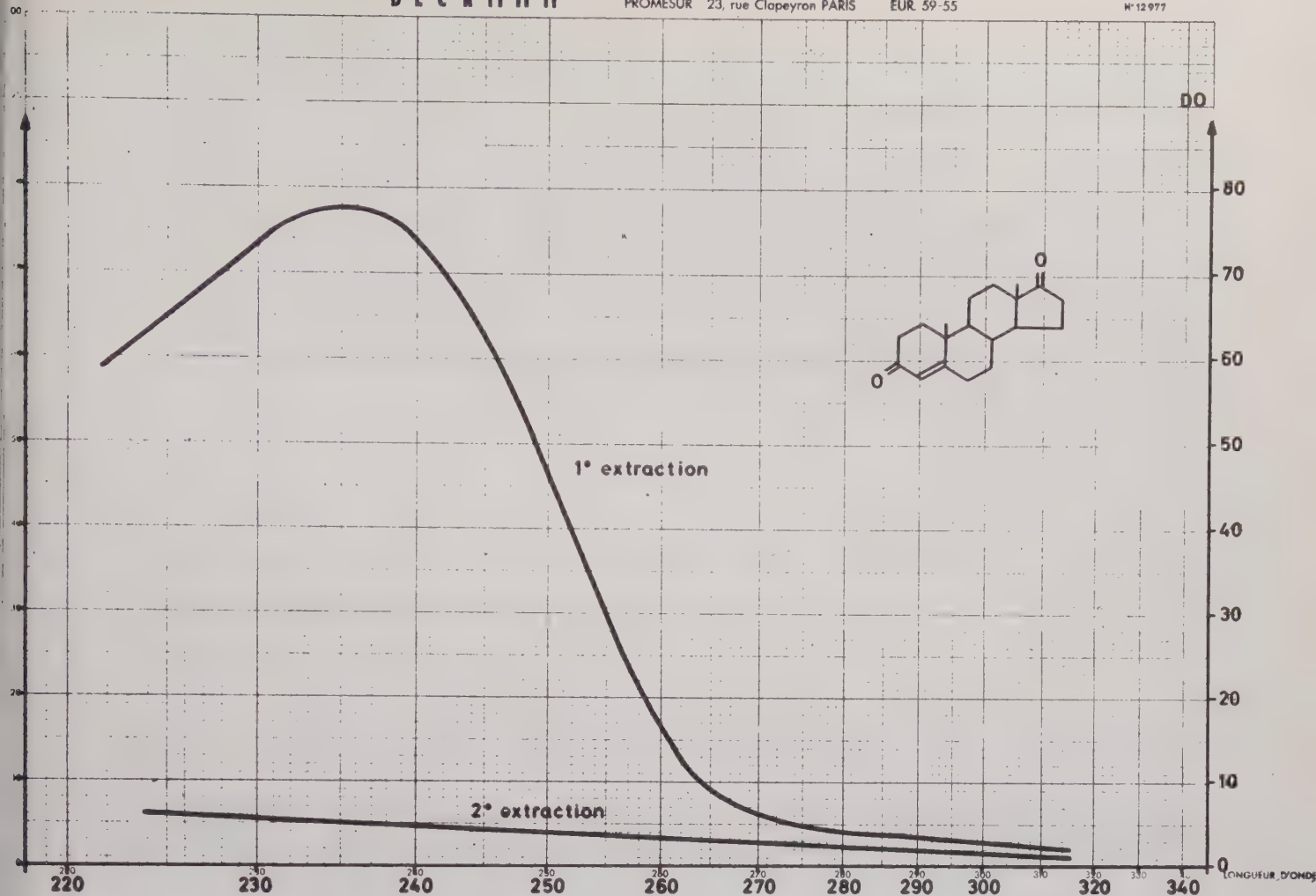


FIGURE 7

avant coloration (les cétones conjuguées avec une double liaison absorbent à 254 mμ).

B.- Pour isoler les dérivés de la testostérone, on dépose 50 mg d'extrait sur une longueur de 15 cm (dimension du gel : 20 × 20 cm; épaisseur = 0,5 mm). Après migration avec le solvant approprié, les stéroïdes sont repérés par leur absorption en lumière ultra-violette et par leur coloration au réactif AN, que l'on effectue sur une faible partie de la chromatographie. Chaque bande est isolée et le produit élué dans l'acétate d'éthyle.

3°- Mesure de l'absorption en lumière ultra-violette.

Elle a été effectuée avec l'appareil enregistreur BECKMAN DK-2A. (A une unité de densité optique correspond un enregistrement de 25 cm). L'absorption de solution de stéroïde convenablement diluée dans l'éthanol est mesurée contre un témoin éthanol, à une température ne dépassant pas

25° pour éviter toute variation de concentration du produit à doser, par évaporation du solvant.

4°- *Mesure de l'absorption en lumière infra-rouge.*

On utilise le spectrophotomètre Infracord (PERKIN-ELMER). 2 mg de stéroïde sont répartis uniformément dans une pastille de 200 mg de bromure de potassium. Le spectre obtenu est étalonné sur le pic d'absorption à 6,24 μ d'un film de polystyrène de 0,07 mm d'épaisseur et est comparé à celui d'échantillon authentique (NEUDERT et ROPKE, 1965).

o
o o

VII. MESURES DE RADIOACTIVITE

Elles ont été effectuées dans deux cas : d'une part pour apprécier si l'enzyme 3 α se forme à partir de protéines que l'on a marquées au soufre S³⁵ dans des conditions bien déterminées, d'autre part pour évaluer l'incorporation de la testostérone à l'intérieur de la bactérie.

1°- Produits radioactifs :

- DL-cystéine S³⁵; période 87,1 jours; activité spécifique : 7,1 mc/mMole
- Testostérone 4C¹⁴; activité spécifique : 9,3 mc/mMole.

2°- Mesure de la radioactivité par scintillation en milieu liquide.

(Appareil PACKARD TRICARB F 314). Dans cette méthode l'énergie de la particule primaire est convertie en lumière par une solution scintillante, un photomultiplicateur répondant à cette énergie lumineuse par la production d'une charge électrique amplifiée et enregistrée par un circuit de comptage. Le liquide scintillant utilisé est constitué par :

2,5-diphényle oxazole	(P P O)	4,00 g
1,4-bis 2(4-méthyle,5-phényle oxazolyle)-benzène	(POPOP)	0,05 g
Toluène		1 litre

a)- Dans le cas de comptage des fractions obtenues par électrophorèse en tampon TRIS-HCl 0,025 M, et dont certaines sont marquées par la cystéine S³⁵, la méthode suivante a été adoptée pour les fractions contenant une activité enzymatique : plusieurs fractions sont réunies de manière à obtenir 50 μ g de protéine. Sur ce mélange, une dernière mesure d'activité enzymatique et une dernière mesure de masse protéique sont faites (méthode de LOWRY). On complète à 5 ml, par du tampon TRIS-HCl 0,025 M. La solution est ensuite évaporée à sec.

Le résidu est repris par 0,25 ml d'eau distillée, 4 ml d'éthanol et 11,4 ml de liquide scintillant. Les comptages sont ainsi effectués sur la même quantité de protéine et de tampon TRIS-HCl pour avoir un effet de quenching identique, donc des résultats comparables entre eux.

Dans les conditions de comptage du carbone C^{14} , le rendement de l'appareil est de 35,4%. Le nombre de coups comptés par minute est compris entre 134 pour les plus faibles activités et 745 pour les plus fortes, avec un bruit de fond de 5 coups/minute.

b)- Mesure de la quantité de testostérone $4C^{14}$ ayant pénétré dans la bactérie : un filtre Millipore (diamètre 2,5 cm; pore de 0,45 μ) retenant 100 μ g de bactéries sèches est déposé au fond des fioles de comptage. 15 ml de liquide scintillant sont ajoutés.

Dans les mêmes conditions que précédemment, avec un rendement de l'appareil de 49,7%, le nombre de coups comptés par minute est compris entre 1.000 et 3.000 suivant les échantillons.

3°- Calcul du nombre de coups vrais N_0 au temps 0, à partir du nombre de coups comptés N au temps t .

Il n'a été effectué que pour le soufre S^{35} dont la période est courte, en utilisant la formule :

$$\log N = \log N_0 - \lambda t \log e$$

où $\lambda = \frac{0,693}{T}$, T étant la demi-vie de l'élément radioactif et e la base des logarithmes népériens ($\lambda \cdot \log e = 0,00345$).

o
o o

VIII. ORIGINE DES PRODUITS UTILISES

L'origine des produits chimiques utilisés dans les différentes manipulations que nous venons de citer, est la suivante :

- *Milieux de culture* :

DIFCO (extrait de levure, hydrolysats de caséine exempt de vitamine); FLUKA (thiamine, riboflavine, panthoténate de calcium, pyridoxine, biotine, amide nicotinique et les produits suivants de qualité "puriss" : acide D-lactique, acide succinique, acide fumarique, acide α -cétoglutarique, acide citrique, acétate de sodium, acide pyruvique, D + glucose); Laboratoire du BOIS DE BOULOGNE (Tween 80, glycine, DL-valine, DL-séfine); NUTRITIONAL BIOCHEMICALS C^o (L-proline, L-sérine, L-isoleucine); CALBIOCHEM (produits A grade : tous les autres acides aminés); PROLABO (produits "pour analyse" : tous les autres constituants des milieux de culture).

- *Dosage enzymatique* :

SIGMA CHEMICAL C^o (NAD⁺); UCB (pyro-phosphate de sodium pour analyses); MERCK (carbonate acide de sodium); STERALIDS (3 α -hydroxy, 17-oxo, 5 α -androstane).

- *Dosage de protéine* :

BIOLYON (Réactif de FOLIN); UCB (produits pour analyse, pour réactif du biuret); ARMOUR (sérum-albumine de boeuf, cristallisée).

- *Purification de l'enzyme* :

SPECIA (sulfate de streptomycine); MERCK (sulfate d'ammonium); SIEGFRIED (EDTA); FLUKA (glycérol anhydre, β -mercaptoéthanol, TRIS); PHARMACIA (Séphadex G 100).

- *Stéroïdes* :

Ils nous ont été aimablement communiqués par les directeurs des laboratoires suivants :

- 1- DE BRUYN - Laboratoire PHILIPS - DUPHAR WEEPS, Pays-Bas.
- 2- H.H. FLOCH - Présente adresse : Ecole de Médecine, Brest.

- 3- GASTANBIDE - Faculté des Sciences, Reims.
 - 4- J. JACQUES et H. KAGAN. - Laboratoire de Chimie Organique des hormones, Collège de France, Paris.
 - 5- Madame MOUSSERON-CANET - Laboratoire de Chimie Organique. ENSC, Montpellier.
 - 6 G. OURRISSON et M. BLOCK - Laboratoire de Chimie Organique. ENSC, Strasbourg.
 - 7- L. VELLUZ - Laboratoire ROUSSEL-UCLAF, Paris.
- 1 - XLIX
 - 2 - IX, XII, XLVII
 - 3 - XXXIX
 - 4 - XXIX
 - 5 - XVIII, XXV, XXVI
 - 6 - XXVII, XXVIII
 - 7 - XV, XVI, XLI, XLIII

Nous remercions vivement le Professeur CRASTES DE PAULET d'avoir mis à notre disposition les autres stéroïdes utilisés dans le travail exposé au chapitre IV.

- Etude des stéroïdes :

PROLABO, produits pour analyses (acétate d'éthyle, chloroforme, sulfate de sodium, acide acétique, anisaldéhyde, éthanol); MERCK (Kieselgel GF₂₅₄).

- Mesures de radioactivité :

PACKARD (PPO, POPOP); MERCK (toluène); la cystéine S³⁵ et la testostérone 4C¹⁴ ont été préparées au Centre d'Etude Nucléaire de SACLAY, département des molécules marquées.



IX. RESUME DU CHAPITRE I

- Culture des bactéries :

L'étude des caractères culturels de *Pseudomonas testosteroni* (ATCC 11 996) met en évidence que cette bactérie aérobie stricte, non porteuse de pigment fluorescent, dont le métabolisme glucidique est pauvre, est caractérisée par sa possibilité d'oxyder les stéroïdes à 19 atomes de carbone.

Les milieux de culture les plus fréquemment utilisés sont constitués par : 1°- une solution de base tamponnée apportant une source d'azote ammoniacale; 2°- une solution d'éléments; 3°- une source de carbone sous forme d'acide succinique ou d'hydrolysate de caséine, ou d'un autolysat de levure.

L'ensemencement de ces milieux par un inoculum important de bactéries en cours de multiplication permet d'obtenir d'emblée une culture en phase de croissance exponentielle. L'induction du 3 α -enzyme est obtenue par addition d'une quantité de stérol totalement soluble (0,3 m M). La croissance est suivie par mesure de la densité optique des suspensions bactériennes à 650 m μ .

- Obtention de l'extrait enzymatique :

L'activité enzymatique étant retrouvée à l'intérieur des bactéries, sa mise en évidence nécessite la disruption des cellules. Celle-ci est effectuée par traitement des suspensions aux sons (10 Kcycles pendant 10 minutes, appareil Raythéon) ou aux ultra-sons (20 Kcycles, 5 minutes, appareil Sonifier).

- Dosage enzymatique :

Les meilleures conditions de dosage ont été déterminées. Nous nous sommes particulièrement attaché à conserver le pH optimum d'activité de l'enzyme, par une quantité suffisante de substance tampon et une molarité adaptée des solutions de NAD⁺ et du tampon d'extraction. Les mesures de cinétique enzymatique ont toujours été effectuées de manière à ce que la

vitesse initiale de la réaction ne dépende que de la quantité d'enzyme. Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode au biuret ou par la méthode de LOWRY.

- *Purification de l'enzyme*

On a utilisé successivement le sulfate de streptomycine pour éliminer les acides nucléiques, le sulfate d'ammonium pour précipiter la protéine enzymatique. Les fractions les plus riches en activité enzymatique, une fois solubilisées, sont soit filtrées sur gel de Séphadex G 100, en tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7,2, soit soumises à une électrophorèse en veine liquide (tampon TRIS-HCl 0,025 M, pH 8,2).

- *Techniques de l'étude des stéroïdes :*

Après extraction par l'acétate d'éthyle ou le chloroforme, les stéroïdes sont éventuellement isolés par chromatographie sur couche de Kieselgel GF₂₅₄. Leur caractérisation est effectuée par appréciation de leur R_F; mesure de leur absorption en lumière ultra-violette et en lumière infra-rouge.

- *Les mesures de radioactivité* sont faites par scintillation en milieu liquide.

5

5 5

C H A P I T R E I I

ETUDE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE
ET DU METABOLISME DE LA TESTOSTERONE

ETUDE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE ET DU METABOLISME DE LA TESTOSTERONE

Il nous a paru indispensable de mesurer assez précisément la croissance de *Pseudomonas testosteroni* avant d'aborder les problèmes d'induction.

Cette étude a été réalisée en suivant, en fonction du temps, l'évolution de la densité optique de la culture à 650 mμ. Nous avons déterminé qu'un millilitre de culture dont la densité optique est 1 contient $6,2 \cdot 10^8$ bactéries et correspond à un poids de 460 μg. L'importance de la multiplication bactérienne est évaluée par le taux de croissance (nombre de divisions en une heure) ou le temps de génération (temps nécessaire pour que la masse bactérienne double de poids). La croissance totale est définie par la différence entre le poids sec d'un volume défini de culture en phase stationnaire et le poids sec du même volume juste après l'ensemencement. Enfin le rendement pour un substrat donné correspond au rapport croissance totale (poids sec)/poids de l'aliment utilisé en quantité limitante (MONOD, 1942).

Les meilleures conditions de culture de *Pseudomonas testosteroni* ont été tout d'abord recherchées et les résultats sont rapportés dans le premier paragraphe. L'introduction du stéroïde comme inducteur crée de nouvelles conditions de culture, en raison même de la nature insoluble de ce produit. Ces modifications sont étudiées dans le deuxième paragraphe.

I. MILIEU DE CULTURE SANS TESTOSTERONE

1° - MEILLEURES CONDITIONS DE CULTURE : RECHERCHES ET RESULTATS.

La solution de base telle qu'elle est décrite dans le chapitre I apporte une source d'azote, ainsi que des anions et des cations en quantité suffisante. Différents essais ont été réalisés pour déterminer la source de carbone permettant une bonne croissance.

A)- Les glucides ne constituent pas une source de carbone facilement assimilable par *Pseudomonas testosteroni* : il en est ainsi pour des diholosides (lactose, saccharose, maltose), des oses (glucose, galactose) ou des polyalcools (glycérol, mannitol). Nous avons testé différents produits du métabolisme intermédiaire et apprécié leur rôle sur la croissance en nous référant à la longueur du temps de latence et aux valeurs du taux de croissance et de la croissance totale. L'examen de la figure 8 montre que parmi les différents substrats utilisés à la concentration de 2 grammes par litre, l'acide succinique donne le temps de latence le plus court, le taux de croissance le plus élevé (0,5) ainsi que la croissance totale la plus forte (565 mg de bactéries en poids sec pour un litre de milieu). On a vérifié que cette dernière valeur est bien proportionnelle à la quantité de substrat jusqu'à 2g par litre ($1,7 \cdot 10^{-2}$ M) (figure 9). Le rendement est alors de 0,28. Les croissances avec l'acide fumarique, l'acide α -céto-glutarique, l'acide D-lactique diffèrent de celle obtenue avec l'acide succinique, par un temps de latence plus long, ce temps pouvant atteindre 12 heures avec l'acide citrique (non porté sur la figure 8) alors que la croissance totale avec ce dernier substrat est voisine de celle avec l'acide succinique. La croissance sur acétate de sodium ($\text{CH}_3\text{COO Na}$, $3\text{H}_2\text{O}$: 2 g par litre), est plus faible mais son rendement rapporté au nombre d'atomes de carbone (g de bactéries sèches par litre/nombre d'atome-grammes de carbone par litre) est de 8,7; il est donc voisin de celui obtenu avec l'acide succinique (8,3).

B)- Les protides apportés sous forme d'hydrolysate de caséine exempt de vitamine, constituent une bonne source de carbone. Le temps de génération varie entre 62 et 70 minutes, la croissance totale correspondant à 600 mg de bactéries sèches pour 5g d'hydrolysate par litre de milieu. Cette

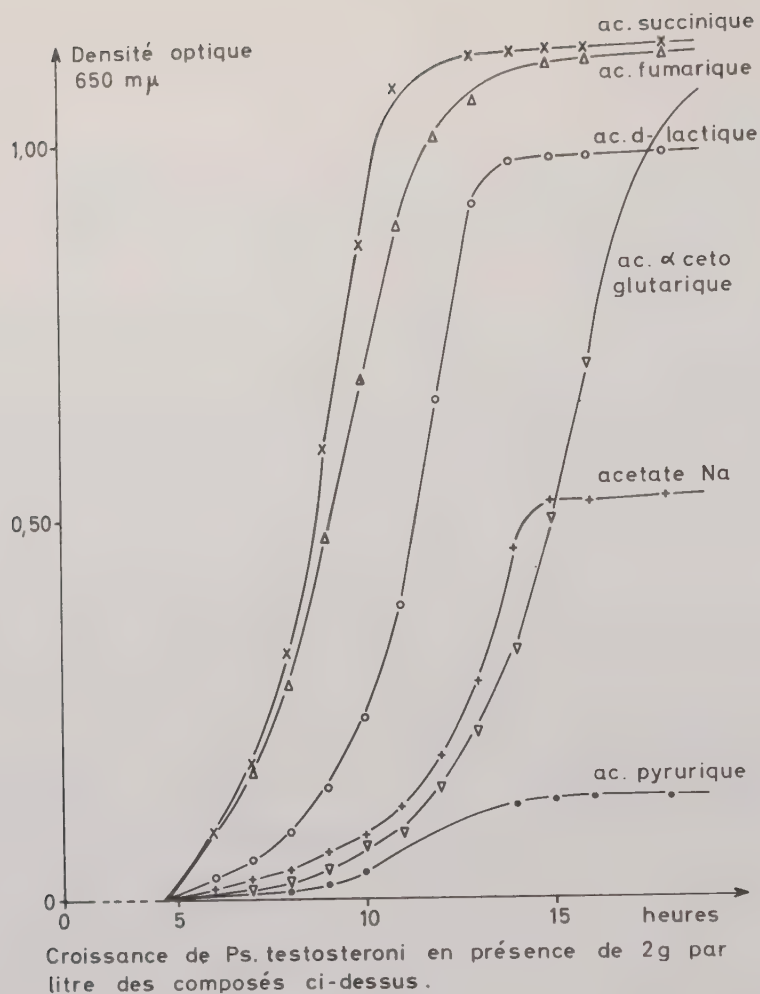
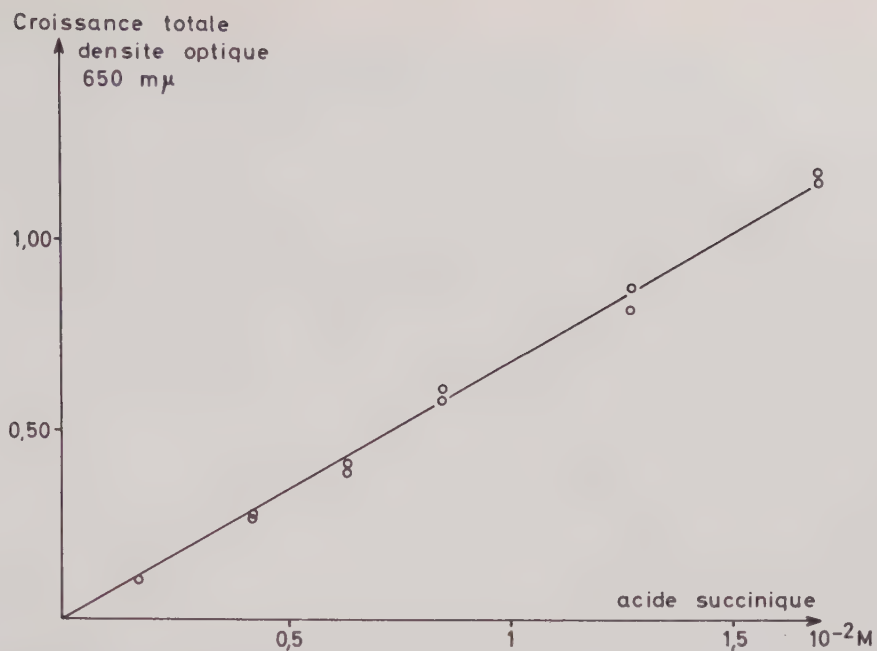


FIGURE 8

croissance est bien proportionnelle à la quantité de caséine jusqu'à 5 g par litre et n'est pas limitée par un autre facteur (figure 10). L'addition de glucose ou de (glucose + vitamines) selon WACKER n'apporte aucune modification dans la croissance, comme le montre la figure 11. Ces derniers résultats confirment ceux concernant l'étude de la souche et exposés dans le chapitre I, I. 1°.

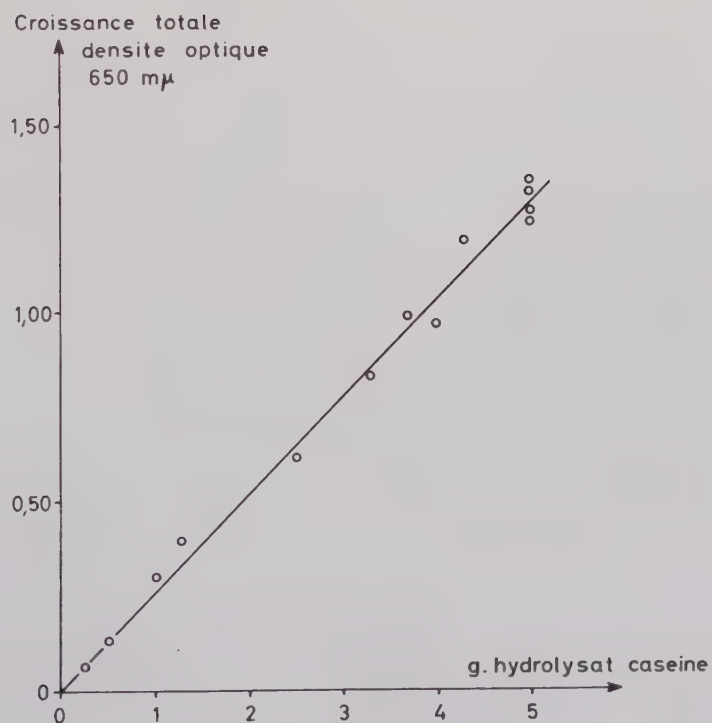
L'extrait de levure est également un bon substrat : le temps de génération est compris entre 55 et 60 minutes avec une croissance totale correspondant à 1400 mg de bactéries sèches pour 10 g d'extrait de levure par litre de milieu.

La croissance sur milieu à la cystéine sera examinée dans le chapitre III.



Influence de la concentration en acide succinique sur la croissance totale.

FIGURE 9



Influence de la concentration en hydrolysate de caseine sur la croissance totale.

FIGURE 10

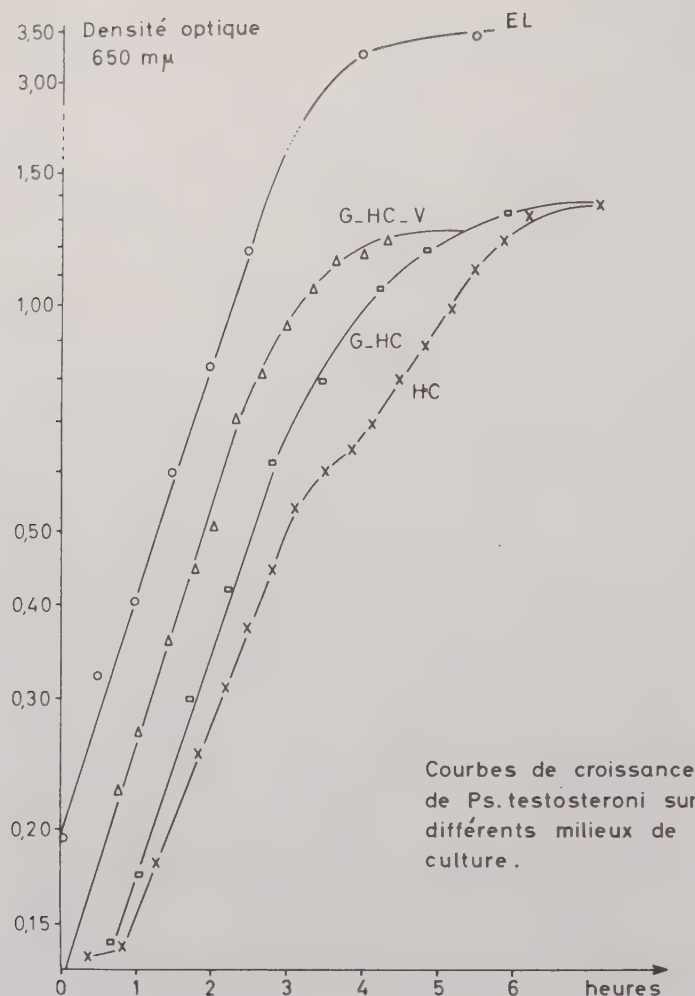


FIGURE 11

C)- L'influence du pH sur la croissance a été recherchée sur milieu S à l'acide succinique (figure 12). Les résultats montrent que la croissance à la 13ème heure de culture est totale pour des pH compris entre 5,5 et 7,2. Elle est faible pour des pH supérieurs à 7,5 ; elle est nulle pour un pH de 4,6. Au cours de la multiplication bactérienne, une alcalinisation progressive du milieu de culture est observée. Elle se produit quelle que soit la composition du liquide nutritif et pour une même composition quel que soit le pH initial. A partir d'un pH initial de 7,2 on obtient un pH de 7,85 après 9 heures de culture sur milieu G-HC (figure 13). L'alcalinité continue à augmenter pendant la phase stationnaire et atteint des valeurs allant de 9,0 à 9,2.

D)- Signalons enfin que la culture de *Pseudomonas testosteroni* est également possible à des forces ioniques allant de 2,95 à 14,75 M exprimé en PO_4^{3-} .

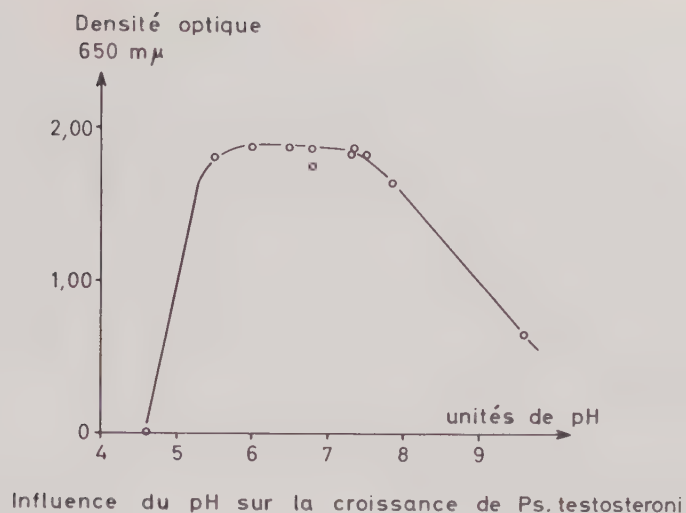


FIGURE 12

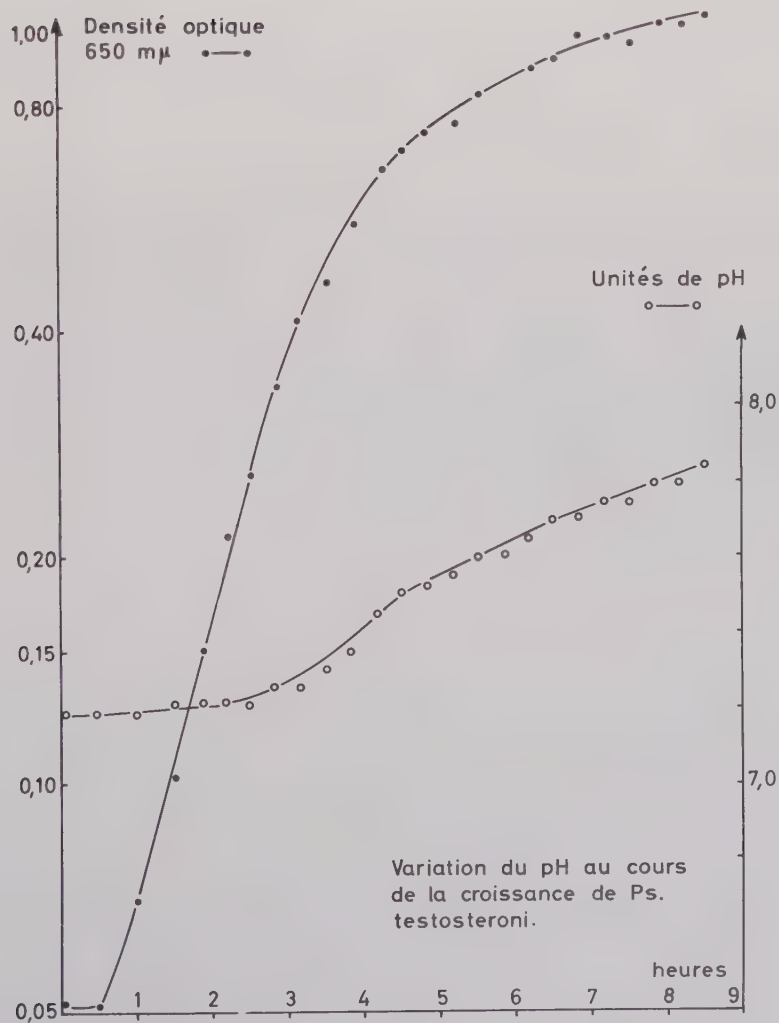


FIGURE 13

2* - DISCUSSION.

L'acide succinique constitue une source de carbone facilement assimilable pour *Pseudomonas testosteroni*. D'autres produits du métabolisme intermédiaire peuvent également être utilisés, mais moins rapidement ou avec un rendement plus faible. Par ailleurs on constate pour ces différents substrats qu'il n'y a pas de relation entre les valeurs du taux de croissance et de la croissance totale. Ces faits sont en accord avec ceux concernant la culture d'*E. coli* et de *B. subtilis* en présence de différents hexoses (MONOD, 1942).

Les hexoses, les diholosides ne sont pas facilement oxydés. Ces résultats semblent être comparables à ceux obtenus avec d'autres *Pseudomonas* où la dégradation du glucose ne peut être conduite que par les voies d'ENTNER-DOUDOROFF ou de WARBURG-DICKENS aboutissant à la formation de 3-phospho-glycéraldéhyde à partir de 6-phospho-gluconate.

L'utilisation de substrats plus complexes tels que l'hydrolysât de caséine ou l'extrait de levure est d'interprétation plus délicate. La notion de rendement, en effet, doit être appliquée avec prudence à des mélanges dont le nombre de constituants limitant la croissance n'est pas connu. On peut cependant noter que le rendement de 0,11 obtenu sur milieu à l'hydrolysât de caséine, suggère que certains constituants ne sont pas utilisés par la bactérie. La même remarque peut s'appliquer au milieu L à l'extrait de levure (rendement 0,14), la multiplication bactérienne étant en plus limitée, dans ce cas, par la faible tension d'oxygène dont dispose chaque cellule, en raison de l'augmentation importante du nombre de bactéries après quelques heures de culture.

II. MILIEU DE CULTURE AVEC TESTOSTERONE

Nous allons étudier successivement : les nouvelles conditions de culture créées par la présence de testostérone, l'évolution de la testostérone sous l'action du métabolisme bactérien. La cinétique d'induction du 3 α -enzyme est analysée dans le chapitre V.

1°- CONDITIONS DE CULTURE EN PRESENCE DE TESTOSTERONE.

Le plus souvent les cultures sont effectuées en présence de testostérone, ou d'un autre stéroïde parfaitement déterminé dans le but d'induire le 3 α -enzyme. Parmi les différents substrats utilisés au paragraphe précédent et donnant un taux de croissance, ainsi qu'une croissance totale élevés, il est donc nécessaire de faire un choix de telle sorte que le milieu :

- ne contienne aucun autre stérol que celui qui a été apporté,
- permette la solubilisation de la plus grande quantité possible de stérol
- donne une masse bactérienne riche en 3 α -enzyme.

A)- Pour satisfaire à la première condition, la verrerie est rincée à l'acétone avant l'emploi. Les fioles de FERNBACH sont bouchées par du coton entouré d'une gaze, pour maintenir une bonne aérobie. Le risque de contamination des milieux par les stérols végétaux, possibilité signalée par ANDERSON (1930) nous a semblé négligeable. Nous avons enfin utilisé des substrats parfaitement définis : soit un des composés du cycle de KREBS tel que l'acide succinique, soit un hydrolysate de caséine où nous n'avons pas noté la présence de stéroïde.

B)- La solubilisation du stérol dans le milieu de culture est absolument nécessaire pour apprécier la transformation de ce substrat par la bactérie ainsi que son effet inducteur. Les dosages que nous avons effectués après extraction de la testostérone mettent en évidence deux faits :

- a)- pour un même milieu de culture, la solubilisation n'est pas instantanée à partir du moment où l'on ajoute la testostérone. Ces faits seront discutés dans le chapitre V.

b)- La solubilité de la testostérone dans différents milieux est d'autant plus grande que la composition est plus complexe. Le pouvoir de solubilisation est apprécié de la manière suivante : un litre de milieu de culture auquel sont ajoutés 500 mg de testostérone est chauffé à 100° pendant 30 minutes, puis à 60° pendant 16 heures. Le surnageant obtenu après centrifugation à 22.000 g pendant 10 minutes, est filtré sur papier WHATMAN n°1. L'extraction est réalisée suivant la technique précisée au chapitre I.

Parmi les milieux S au succinate, S-HC au succinate et à l'hydrolysate de caséine, G-HC au glucose et à l'hydrolysate de caséine et L à l'extrait de levure, seul ce dernier milieu donne des concentrations supérieures à 100 mg par litre de testostérone soluble alors que le milieu G-HC donne des valeurs comprises entre 80 et 100 mg suivant le temps de contact avec l'inducteur. Les deux autres liquides nutritifs ne solubilisent que des quantités allant de 30 à 50 mg par litre.

c)- La production d'enzyme par les bactéries semble être également en relation directe avec la complexité du milieu comme le montre le tableau 2 :

TABEAU 2

MILIEU DE CULTURE	QUANTITE DE 3 ^e ENZYME (UI PAR mg DE PROTEINE) APRES UN TEMPS DE CONTACT AVEC L'INDUCTEUR DE	
	4 h	6 h 30
S : Succinate		0,04
S-HC : Succinate et hydrolysate de caséine	0,03	0,06
G-HC : glucose et hydrolysate de caséine	0,61	0,84
L : extrait de levure	0,60	0,72

L'interprétation de ces résultats doit tenir compte, d'une part de la faible solubilité de la testostérone sur milieu S et S-HC, ce qui ne permet pas "d'impressionner" efficacement le système d'induction de la bactérie et, d'autre part, du rôle des constituants de faible importance pondérale, apporté par l'hydrolysate de caséine ou l'extrait de levure et pouvant favoriser la synthèse de l'enzyme.

D)- En conclusion, pour satisfaire aux conditions énoncées au début de ce paragraphe, nous avons choisi le milieu G-HC suffisamment défini pour ne pas contenir de stérol contaminant, mais assez complexe pour permettre une bonne solubilisation de la testostérone, et une production d'enzyme

importante, le glucose présent dans le milieu ne pouvant intervenir que comme facteur éventuel de solubilisation.

Les courbes de croissance obtenues sur ce milieu, en l'absence ou en présence de testostérone sont identiques. Or la testostérone est métabolisée et même totalement, puisque LEVY et TALALAY (1959a) ont mis en évidence que le carbone peut être retrouvé quantitativement sous forme de gaz carbonique. Mais cette dégradation est lente, puisqu'elle n'est totale qu'au-delà de 24 heures, alors que la phase stationnaire est obtenue en quelques heures. Il en résulte que les 3% du carbone apportés par la testostérone ne modifient pas sensiblement la croissance.

2° - EVOLUTION DE LA TESTOSTERONE.

TALALAY et ses collaborateurs ont identifié trois dérivés de la testostérone et ont proposé une cinétique d'apparition de ces produits. Dans nos conditions de culture, nous nous sommes particulièrement attaché à élucider l'ordre exact d'apparition des métabolites. L'un d'eux peut en effet avoir un rôle inducteur particulier (induction dite séquentielle). Nous comparerons donc ici les données déjà connues avec les résultats que nous avons obtenus.

A) - Produits isolés à partir d'une culture réalisée en présence de testostérone.

LEVY et TALALAY (1959a) ont signalé qu'après culture sur milieu au lactate de sodium (5g par litre), trois dérivés peuvent être séparés : ce sont le 3,17-dioxo, androsta-4-ène (II); le 3,17-dioxo, androsta 1,4-diène (III) et éventuellement le 17 β -hydroxy 3-oxo, androsta 1,4-diène (IV).

A partir d'une culture en milieu G-HC nous avons trouvé 5 produits. La séparation a été effectuée par chromatographie préparative sur gel de silice GF 254 d'extraits provenant de culture d'âge différent de manière à ne pas avoir simultanément plus de 3 stéroïdes. L'identification de ces derniers a été basée sur leur R_F , leur spectre en lumière ultra-violette et infra-rouge (figures 14, 15, 16) que l'on a comparé à ceux d'échantillons authentiques.

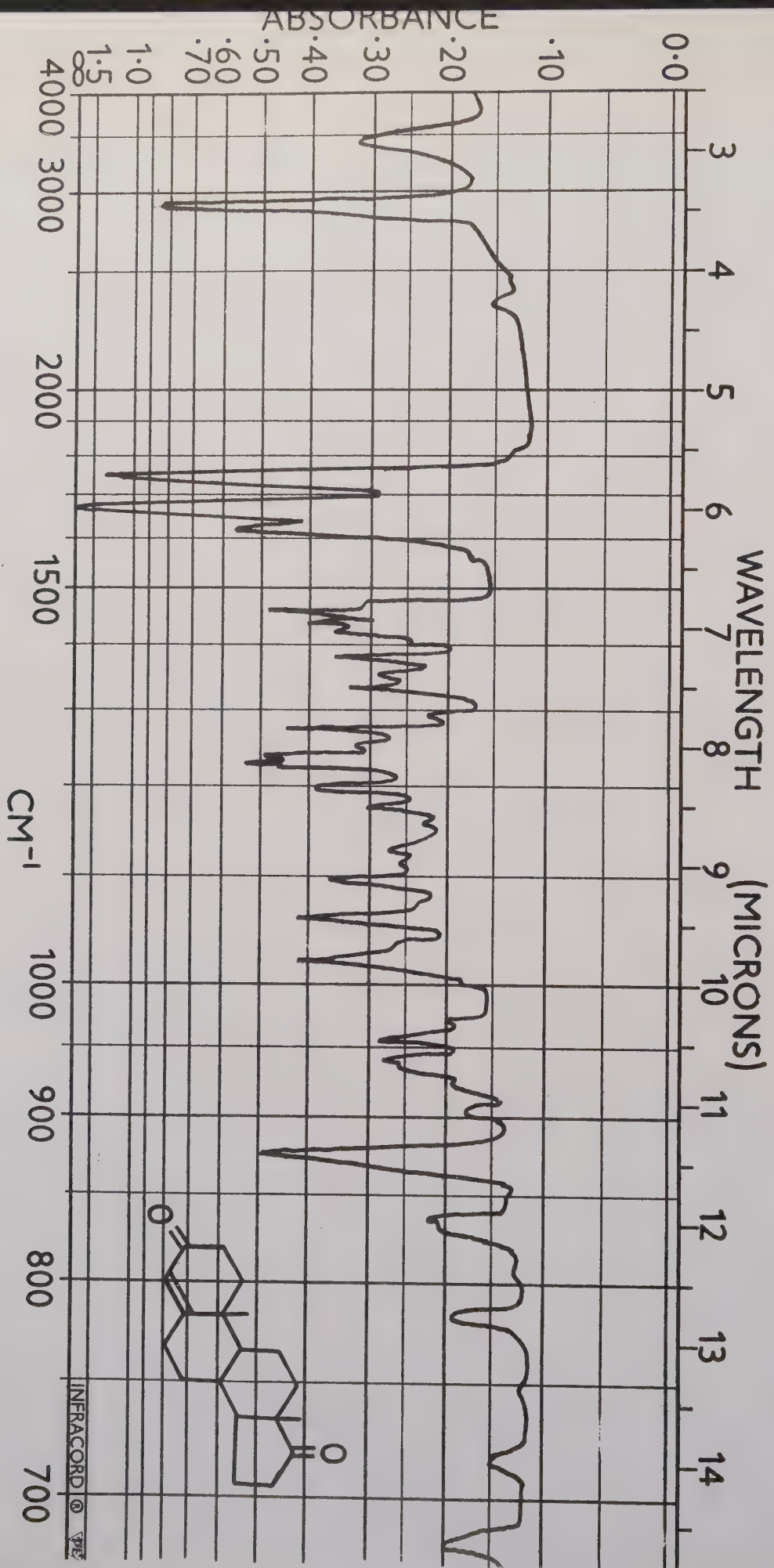


Figure 14 - SPECTRE IR

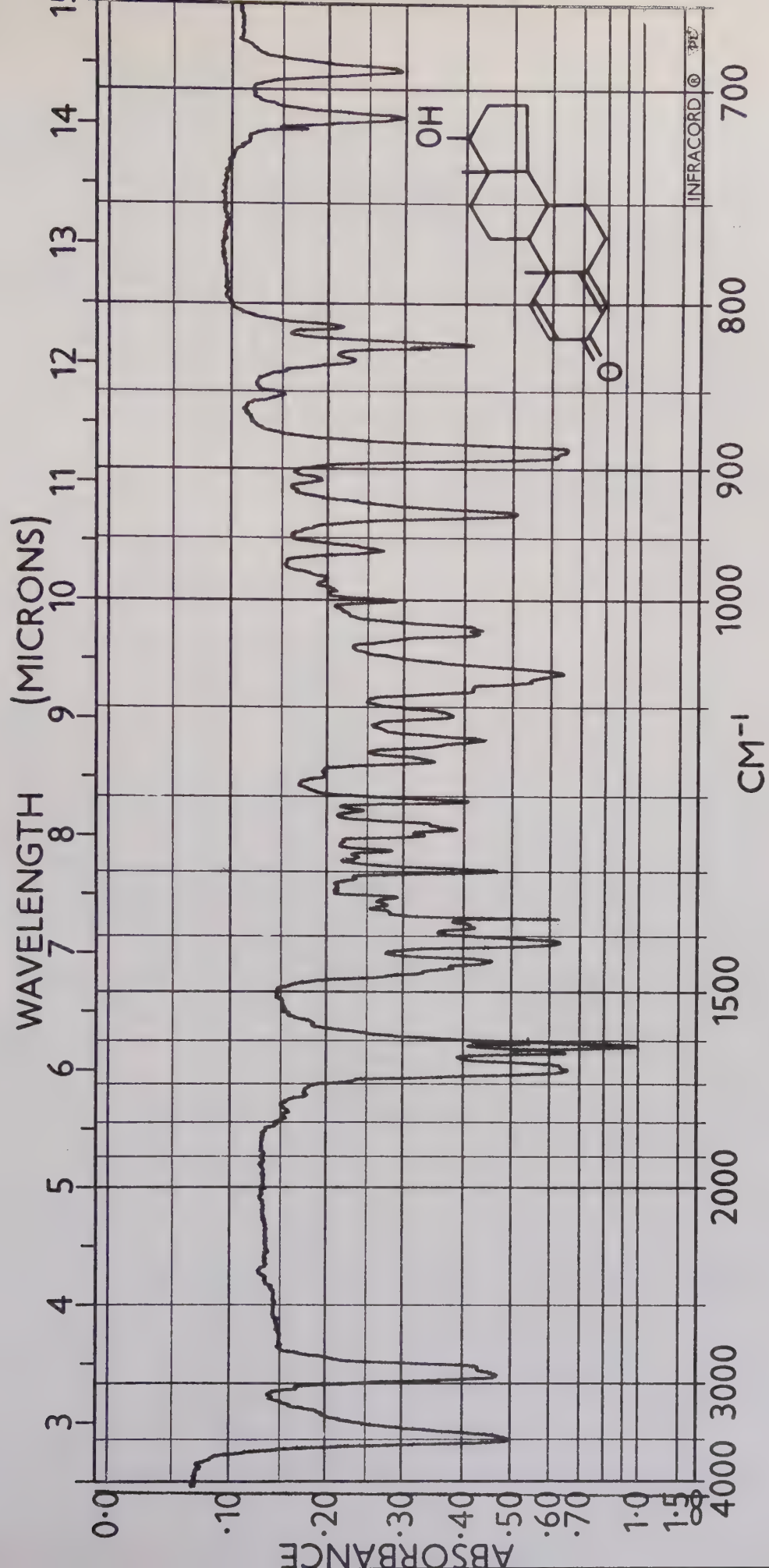


Figure 15-SPECTRE IR

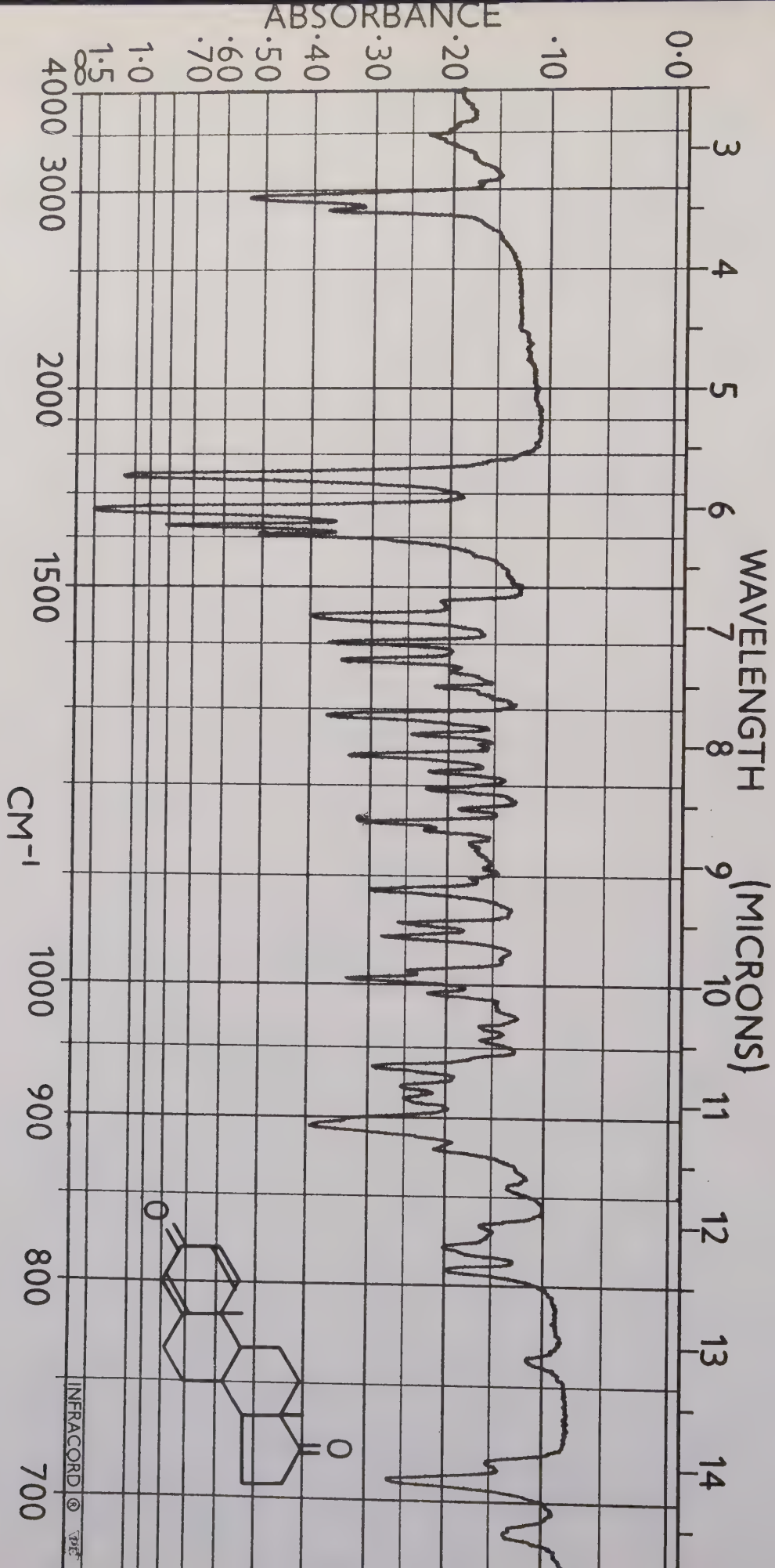
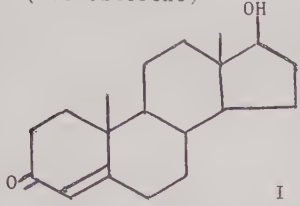
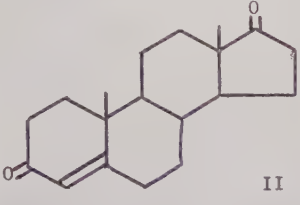
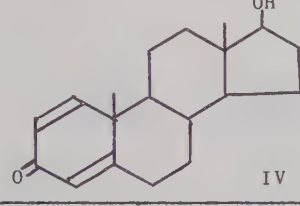
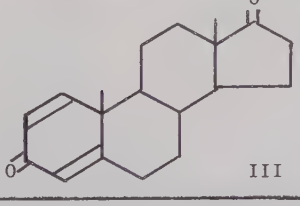


Figure 16 - SPECTRE IR

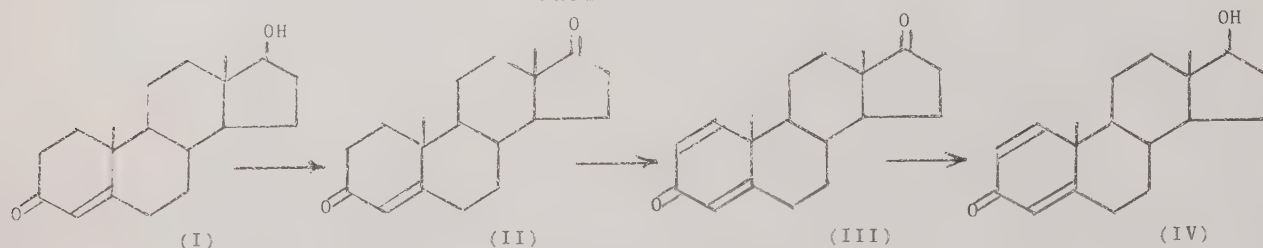
TABLEAU 3

	R_F Solvant : benzène 3 éther 7	Absorption maximum (solvant éthanol) en lumière ultraviolette à la longueur d'onde $m\mu$ de :		Caractéristiques du spectre IR ν cm^{-1}
		d'après SCOTT	d'après nos essais	
17 β -hydroxy, 3-oxo androsta, 4-ène (testostérone)  I	0,33	241	240	
3, 17-dioxo, androsta, 4-ène  II	0,40	240	238	$\nu_{C=O}$ 1745 $\nu_{C=O}$ 1660 $\nu_{C=C}$ 1610
17 β -hydroxy, 3-oxo androsta, 1,4-diène  IV	0,22	243	242	$\nu_{C=O}$ 1660 $\nu_{C=C}$ 1620 $\nu_{C=C}$ 1605 ν_{C-OH} 1005
3, 17-dioxo, androsta, 1,4-diène  III	0,35	244	242	$\nu_{C=O}$ 1740 $\nu_{C=O}$ 1660 $\nu_{C=C}$ 1620 $\nu_{C=C}$ 1600
V	0,44			
VI	0,24			

B) - Cinétique d'apparition des dérivés de la testostérone.

LEVY et TALALAY ont proposé le schéma de dégradation suivant :

TABLEAU 4



Des essais nous ont montré quelques différences dans l'ordre de cette séquence. Ainsi, au cours d'une culture sur milieu G-HC nous avons effectué des prélèvements toutes les 30 minutes, puis l'extraction des stéroïdes suivant les conditions données au chapitre I. La séparation des produits a été réalisée par chromatographie sur couche de gel de silice. La figure 17 résume les résultats obtenus par cette méthode, alors que les figures 18 et 19 représentent les premières étapes de la culture. Dès les premières quinze minutes succédant à l'introduction de la testostérone, le produit II peut être décelé. Un deuxième dérivé plus polaire apparaît ensuite : il correspond au produit IV et non pas au dérivé III. Les deux stéroïdes II et IV sont alors présents entre 1 et 3 heures après le début de la culture. A partir de 3 heures 30 apparaît le produit III suivi ensuite par les dérivés V et VI, la testostérone disparaissant progressivement, si bien qu'entre 5 et 6 heures on trouve simultanément les stéroïdes II, III, IV, V et VI. La figure 20 montre la présence de haut en bas de V, II, III, IV. A la 7ème heure environ le produit II n'est plus décelable. Finalement vers la 9ème heure seuls subsistent les produits V et VI; la séquence que l'on peut proposer est alors la suivante :

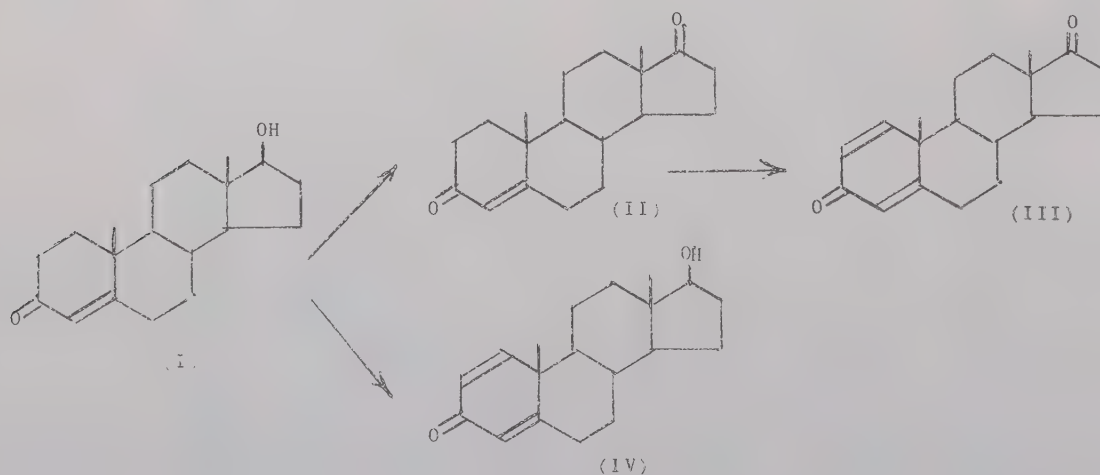
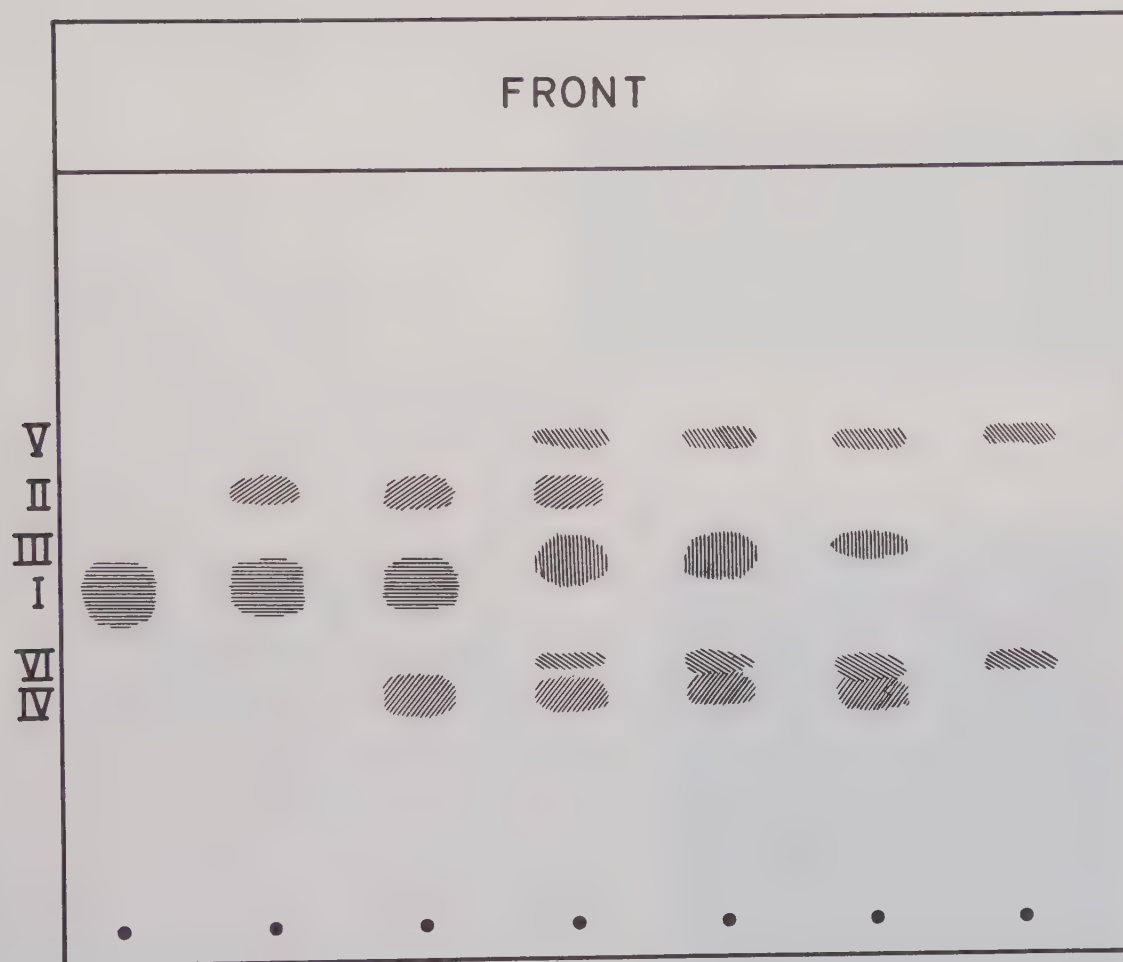
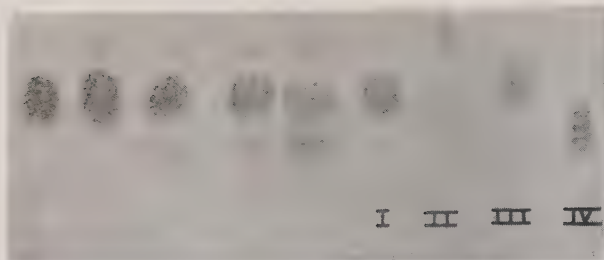


TABLEAU 5



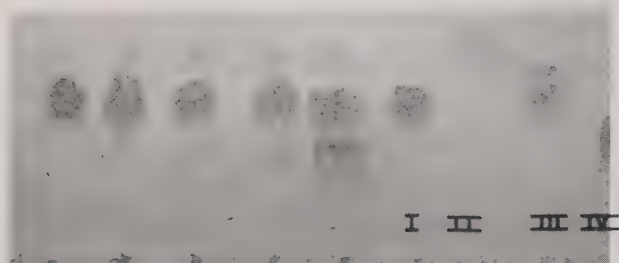
Chromatographie sur gel de silice GF254 de 100 μ g d'extrait sec provenant de prélèvements effectués à des temps différents au cours d'une culture en présence de testostérone (1).
Solvant : Benzène 3 parties, éther 7 parties.

Figure 17



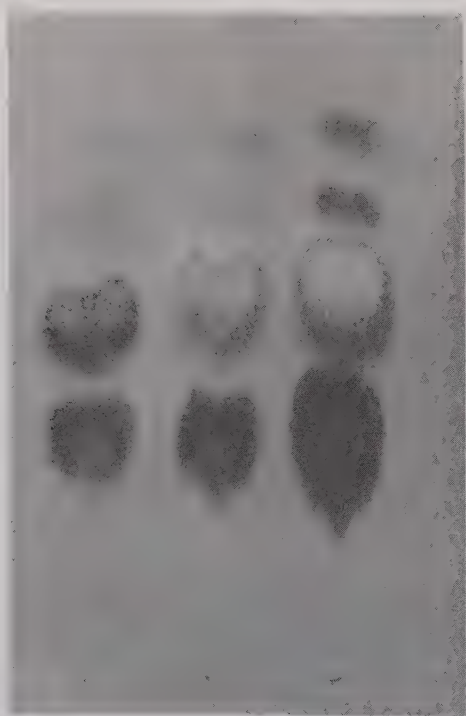
Chromatographie sur gel de silice,
mêmes conditions , absorption en
lumière ultra-violette.

FIGURE 18



Chromatographie sur gel de silice,
mêmes conditions, coloration par
la solution AN : acide acétique -
acide sulfurique - anisaldehyde -

FIGURE 19

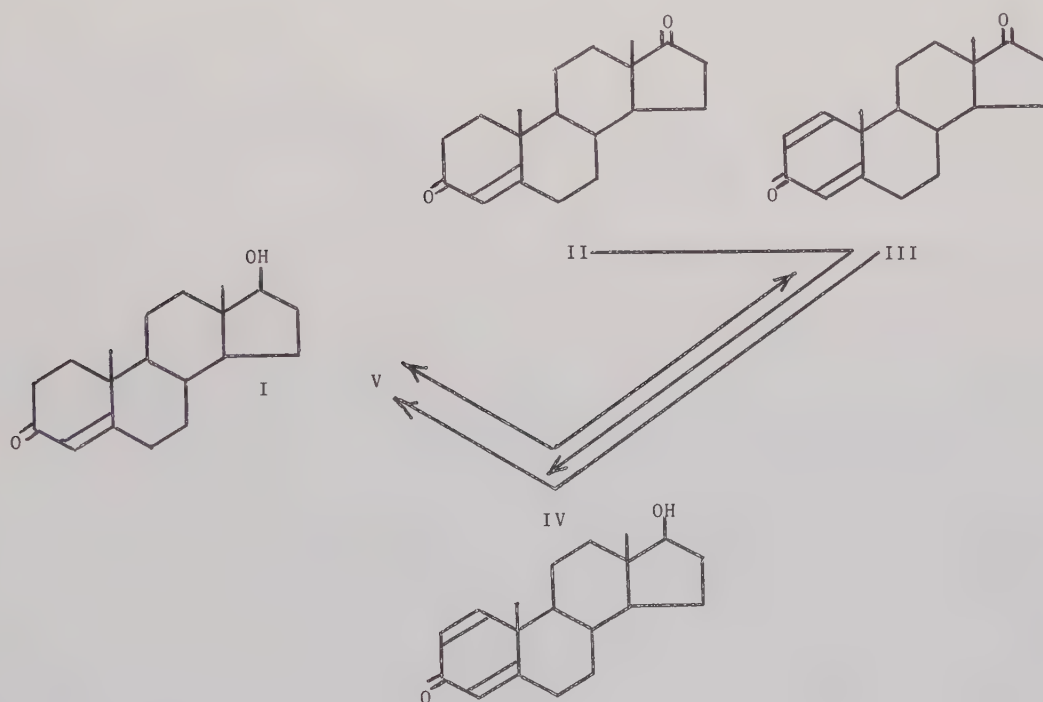


Chromatographie sur gel de silice
d'un extrait réalisé à partir d'une
culture de 5 heures; coloration par
la solution AN.

FIGURE 20

Bien que les conditions de culture (composition, pH et aération du milieu) aient un rôle non négligeable, cette voie métabolique n'est valable que lorsque le stérol de départ est la testostérone. En effet, lorsque dans les mêmes conditions on incube le produit III, on obtient le dérivé IV. Il en est de même si l'on part du produit II : rapidement on observe la formation de III puis de IV. Quant au composé V il semble bien qu'il dérive du produit IV. Ces données sont résumées dans le tableau 6. Ces résultats sont alors en accord avec ceux de LEVY et TALALAY effectués dans des conditions similaires encore que ces auteurs n'aient pas signalé de produits au delà de IV.

TABLEAU 6



Nous venons de définir l'ordre d'apparition des dérivés de la testostérone. Relativement peu de métabolites ont été identifiés; mais la nature de ceux qui sont formés tardivement présente pour nous un intérêt moindre : lorsqu'on les trouve dans le milieu de culture, l'enzyme 3 α est déjà décelé depuis 1 à 2 heures. Dans la synthèse de cet enzyme, le rôle des métabolites apparaissant précocement sera étudié dans le chapitre V.

III. RESUME DU CHAPITRE II

La culture de *Pseudomonas testosteroni* a été suivie dans différents milieux en l'absence ou en présence de testostérone.

I. Dans un milieu dépourvu de stérol, les produits du métabolisme intermédiaire constituent une bonne source de carbone, et parmi eux l'acide succinique (taux de croissance de *Pseudomonas testosteroni* = 0,5, rendement 0,28), l'acide fumarique, l'acide α -cétoglutarique, l'acide D-lactique, l'acétate de sodium. L'hydrolysate de caséine et l'extrait de levure qui permettent des taux de croissance voisins de 1, sont utilisés également comme source de carbone. La croissance sur ces milieux s'accompagne d'une légère alcalinisation (le pH évolue de 7,20 à 7,85 après 9 heures de culture sur milieu G-HC).

II. Lorsque la culture doit être effectuée en présence de testostérone, il est nécessaire que tout le stérol ajouté soit sous forme soluble. Les milieux à l'hydrolysate de caséine et à l'extrait de levure conviennent particulièrement bien. Dans ces conditions, l'étude de la cinétique d'apparition des premiers dérivés de la testostérone met en évidence que deux oxydations surviennent rapidement. La première sur le noyau D (formation d'une fonction cétone : produit II), la seconde sur le noyau A (formation d'une double liaison C_1-C_2 : produit IV), cette même réaction transformant secondairement le produit II en produit III. (tableau 5).

Deux autres produits: V (moins polaire que II) et VI (moins polaire que IV) ont été repérés après la 4ème heure d'incubation alors que l'enzyme 3 α est présent.

o
o o

C H A P I T R E I I I

ARGUMENTS EN FAVEUR DE LA NATURE

REELLEMENT INDUITE

DU 3 α -HYDROXYSTEROIDE : NAD-OXYDOREDUCTASE

ARGUMENTS EN FAVEUR DE LA NATURE
REELLEMENT INDUITE DE L'ENZYME
3 α -HYDROXYSTEROIDE : NAD-OXYDOREDUCTASE

En 1952, TALALAY dans sa publication princeps concernant l'activité métabolique de *Pseudomonas testosteroni*, signale que "les enzymes intervenant dans ces oxydations sont adaptatives, puisque l'organisme cultivé sur extrait de levure seul ne peut pas oxyder immédiatement la testostérone". Cette notion est reprise par MARCUS et TALALAY en 1956 qui constatent que "l'addition de certains stéroïdes au milieu de culture augmente l'activité spécifique de 20 à 100 fois". DELIN et PORATH (1964) n'apportent pas de précision sur ce point. Alors que ce travail est déjà entrepris, WACKER et coll. (1965) signalent que "la mitomycine, l'actinomycine D et la puromycine inhibent aussi bien la croissance que l'induction enzymatique". Toujours selon ces mêmes auteurs, certains analogues d'acides aminés (fluoro-phénylalanine, éthionine) ajoutés au milieu de culture, empêchent également l'apparition de l'enzyme 3 α .

Nous rapportons ici quelques essais contribuant à démontrer la nature réellement induite de l'enzyme 3 α , en vérifiant :

- d'une part que cet enzyme n'est pas produit :
 - en l'absence de testostérone,
 - en présence de testostérone et de chloramphénicol à dose inhibant les synthèses protéiques.
- d'autre part que l'enzyme est synthétisé par une culture en phase exponentielle contenant l'inducteur, à partir d'éléments puisés à l'extérieur de la cellule.

I. SYNTHÈSE D'ENZYME EN L'ABSENCE DE TESTOSTERONE; SYNTHÈSE D'ENZYME EN PRESENCE DE TESTOSTERONE ET DE CHLORAMPHENICOL.

A)- CULTURE EN L'ABSENCE D'INDUCTEUR.

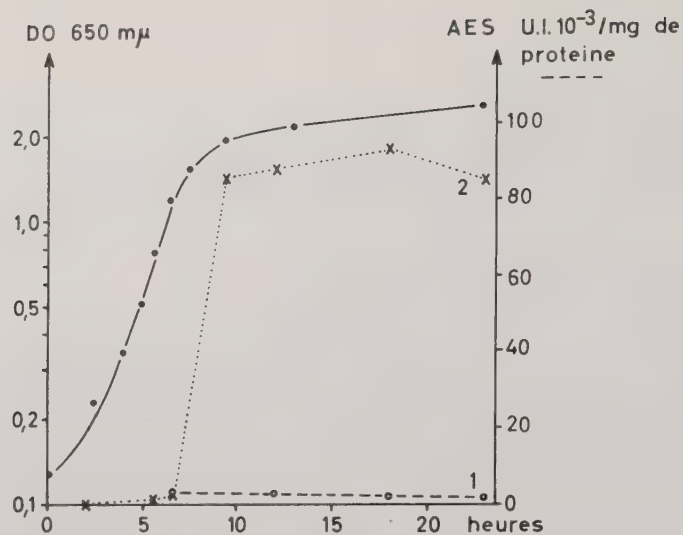
Lorsque l'on effectue une culture sur milieu à l'extrait de levure EL ou sur milieu S à l'acide succinique et que l'on suit l'apparition de l'enzyme, on trouve une activité enzymatique spécifique faible 2.10^{-3} UI par mg de protéine, quelque soit le moment où sont effectués les prélèvements, c'est-à-dire quelle que soit la phase de croissance où se trouve la bactérie (figure 21). Dans les mêmes conditions une culture réalisée en présence de 0,35 mMole de testostérone produit une quantité notable d'enzyme.

B)- CULTURE EN PRESENCE DE TESTOSTERONE ET DE CHLORAMPHENICOL.

Depuis GILES et FOLKES (1953) il est reconnu que le chloramphénicol est un inhibiteur spécifique des synthèses protéiques en empêchant la formation de nouvelles liaisons peptidiques. Pour apprécier son effet sur la synthèse de 3 α -enzyme, nous avons recherché la concentration minimum de chloramphénicol qui détermine la bactériostase de *Pseudomonas testosteronei*. Pour une suspension initiale dense (10^7 bactéries par ml de milieu G-HC) et un temps de contact de 18 heures avec l'antibiotique, on obtient un arrêt de la croissance entre 9 et 12 μ g de chloramphénicol par ml. L'étude du pouvoir bactériolytique après 18 heures montre qu'il y a 30% de survivants à 50 μ g de chloramphénicol par ml.

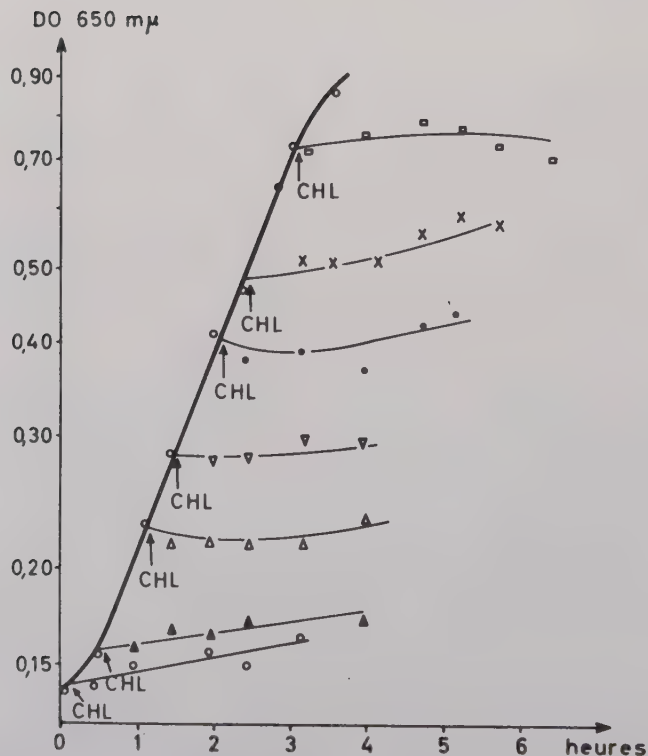
Nous avons choisi cette dernière concentration pour être assuré de l'inhibition immédiate des synthèses protéiques quelle que soit la densité des suspensions bactériennes utilisées. En effet, si à partir d'une même culture initiale en phase exponentielle, on réalise à des temps variables, 7 prélèvements contenant un nombre variable de cellules auxquels on ajoute 50 μ g de chloromycétine par ml (figure 22), on constate que la croissance est inhibée dans tous les cas.

L'étude de la production d'enzyme en fonction du temps, par ces différentes suspensions de *Pseudomonas* montre que l'activité enzymatique ne s'élève pas au delà de 3.10^{-3} UI par mg de protéine, après un temps de contact de plusieurs heures avec l'inducteur. Des essais analogues ont été



Cinétique d'apparition de l'enzyme 3K sur milieu EL, sans addition de testostérone (courbe 1) et avec addition de 0,35 mMole de testostérone au temps 0 (courbe 2). La croissance bactérienne est la même dans les 2 cas.

FIGURE 21



Culture en phase de croissance exponentielle, sur milieu HC. Influence de la chloromycétine (50 μg/ml) sur la croissance de bactéries prélevées à des temps différents.

FIGURE 22

effectués sur des bactéries non proliférantes et les résultats sont identiques (chapitre VI). On peut donc conclure que la production d'enzyme 3 α succédant à l'introduction de testostérone dans une culture de *Pseudomonas testosteroni* est de nature induite.



II. SYNTHÈSE D'ENZYME EN PRÉSENCE DE TESTOSTERONE, PAR DES BACTÉRIES DONT LES PROTÉINES SONT MARQUÉES AU PRÉALABLE PAR LE SOUFRE S³⁵.

Les essais précédents montrent avec suffisamment de netteté la nature induite du 3 α -enzyme. Nous avons cependant utilisé un troisième critère : à partir du moment où l'on ajoute l'inducteur, l'enzyme doit se former aux dépens de constituants puisés dans le milieu de culture et non par remaniement d'un précurseur intra-cellulaire.

En effet, depuis les travaux de ROTMAN et SPIEGELMAN (1954) et de HOGNESS, COHN et MONOD (1955), il est reconnu qu'une bactérie en voie de multiplication, *Escherichia coli* par exemple, à laquelle on ajoute un inducteur (méthyle- β -D-thiogalactoside) synthétise un enzyme induit (β -galactosidase) à partir de constituants puisés dans le milieu extérieur à la cellule. Ces résultats ne sont rigoureusement vrais que dans la mesure où la bactérie est en phase de croissance exponentielle car on sait (MANDELSTAM, 1957) qu'il existe un "turn-over" de protéines dans les bactéries à l'état de repos et que l'enzyme induit, synthétisé dans ces conditions, peut être formé à partir de constituants intra-cellulaires.

Notre manipulation consistera donc (selon le protocole de HOGNESS), dans un premier temps, à marquer uniformément par le soufre S³⁵ les protéines bactériennes synthétisées en phase de croissance exponentielle, puis, dans un deuxième temps, d'obtenir à partir de ces mêmes bactéries une deuxième phase de croissance exponentielle dans un milieu neuf non marqué et en présence de l'inducteur, de manière à susciter la production d'enzyme.

Cet enzyme nouvellement formé ne doit pas porter d'activité radioactive. Pour le vérifier, il sera donc nécessaire de l'isoler des autres protéines marquées.

A)- MARQUAGE DES PROTEINES BACTERIENNES.

a- *Choix de l'élément radioactif* : nous employons le soufre S^{35} après nous être assuré que le 3 α -enzyme contient bien du soufre.

En effet, TALALAY et MARCUS (1954) signalent la sensibilité de cet enzyme aux agents réagissant avec les groupements sulfhydriles. En 1956 ces mêmes auteurs insistent sur la nécessité de groupements -SH libres pour que l'enzyme conserve toute son activité. Enfin SQUIRE, DELIN et PORATH (1964) déterminent que la protéine enzymatique contient 10 molécules de méthionine, sur 482 molécules d'acides aminés; ces expérimentateurs disposent d'une quantité trop faible d'enzyme pur, pour réaliser le dosage des résidus 1/2 cystéine.

Le marquage des protéines par le soufre étant significatif, pour le réaliser, nous utilisons un milieu de culture (milieu C, chapitre I) entièrement synthétique et apportant comme seule source de soufre, du soufre S^{35} sous forme de cystéine. Il est à noter que dans ces conditions la bactérie est capable d'utiliser ce substrat.

b- *Détermination de la quantité de soufre à ajouter au milieu de culture et marquage des protéines bactériennes* : il est préférable que la croissance soit limitée uniquement par ce métalloïde. En effet, dans ces conditions, lorsque la culture se trouve en phase stationnaire, tout le soufre a disparu du milieu et est incorporé aux protéines cellulaires. Nous avons donc remplacé les 27,9 mg de soufre provenant des constituants d'un litre de milieu S, par 3,6 mg apportés sous forme de cystéine. Cette concentration est telle que, lorsque tout le soufre est incorporé, on obtient une croissance totale correspondant à une masse bactérienne importante (740 mg de poids sec par litre). Mais cette teneur en soufre ne correspond pas au taux de croissance maximum (figure 23); il est donc nécessaire de poursuivre la culture pendant 48 heures avant d'obtenir la phase stationnaire.

B)- INDUCTION DU 3 α -ENZYME.

Les bactéries obtenues en phase de croissance stationnaire et contenant des protéines marquées au soufre S^{35} , sont séparées de leur milieu de culture, à présent dépourvu d'activité radioactive, par centrifugation à 12.000 g pendant 10 minutes. Pour éliminer cependant toute trace de radioactivité, le culot bactérien est lavé en tampon de SÖRENSEN pH 7,2 et remis en suspension dans un milieu neuf (milieu C) additionné de l'inducteur : la testostérone (8.10^{-4} M). La croissance débute d'emblée en phase

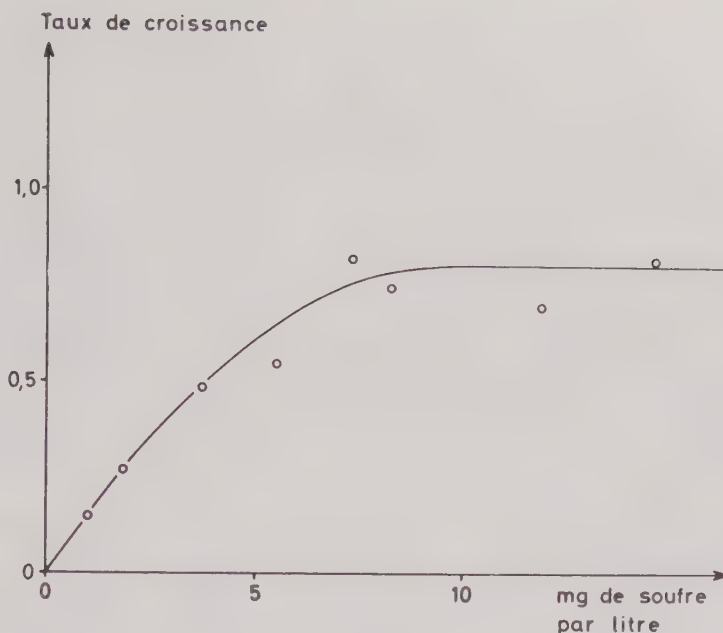


FIGURE 23

exponentielle. Les bactéries sont recueillies après 40 heures de culture, alors qu'elles se trouvent à la fin de cette phase.

C)- ISOLEMENT DE L'ENZYME DES PROTEINES BACTERIENNES.

L'enzyme induit dans ces conditions ne doit pratiquement pas porter d'activité radioactive. Il est donc nécessaire de l'obtenir à un degré de pureté satisfaisant pour l'isoler des autres protéines marquées. Si l'on définit la radioactivité spécifique (RAS) d'un échantillon, par la radioactivité rapportée au mg de protéine, l'étude de la valeur de :

$$R \sim \frac{\text{radioactivité spécifique}}{\text{activité enzymatique spécifique}}$$

à chaque étape de purification permet d'apprécier le marquage de l'extrait contenant l'enzyme. Quatre extraits enzymatiques correspondant à quatre cultures ont été purifiés. Nous rapportons les résultats d'une purification, en signalant ceux obtenus avec une filtration sur gel de dextrane.

D)- ETAPE PRELIMINAIRE : élimination des fragments bactériens sédimentables à 123.000 g.

Les essais suivants sont destinés à montrer que le 3 α -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase est un enzyme soluble non lié par conséquent à

des particules, et que les étapes suivantes peuvent être effectuées sans nécessiter une solubilisation préalable de l'enzyme. Ils n'ont pas été rapportés jusqu'à présent avec les hydroxystéroïdes déshydrogénases bactériennes.

Les suspensions cellulaires sont traitées soit aux ultra-sons (20 Kcycles, 5 minutes), soit aux sons (10 Kcycles, 10 minutes), soit enfin aux fortes pressions (1.406 Kgf/cm²). Les résultats sont portés dans le tableau 7. Ce dernier mode de disruption respecte suffisamment les structures bactériennes pour que l'on puisse affirmer que l'enzyme retrouvé dans le surnageant de centrifugation à 123.000 g est réellement non lié à des particules, à l'intérieur de la bactérie intacte. On constate que la concentration Ce de l'enzyme (activité enzymatique en UI par ml d'extrait) et que l'activité enzymatique spécifique (AES) augmentent légèrement par élimination de fragments non porteurs d'activité enzymatique.

TABLEAU 7

Suspension bactérienne		Extrait brut	Surnageant obtenu à		
Traitement			10.000 g 15 mn	48.000 g 30 mn	123.000 g 60 mn
10 Kc x 10 mn	Ce	103	103	120	127
1.406 Kgf /cm2	Ce AES		41.000 0.62		45.000 0.71

E)- PREMIERE ET DEUXIEME ETAPES.

La précipitation des acides nucléiques par le sulfate de streptomycine est réalisée selon les indications portées dans le chapitre "Matériel et Méthode". La précipitation de la protéine enzymatique est effectuée par gradient de concentration en sulfate d'ammonium de 0 à 40%, puis de 5 en 5%, enfin de 55 à 70%. Les fractions précipitées entre 45 et 55% sont les plus riches en activité enzymatique, celles comprises entre 45 et 50% ont, par contre le rapport R le plus faible (tableau 8). Deux procédés de purification ultérieure sont essayés sur ces fractions.

F)- TROISIEME ETAPE.

a.- Premier procédé.

Essai de filtration sur gel de Séphadex G 100. La filtration a été

TABLEAU 8

	<i>A.E.S.</i> (μ M NAD réduit/min/ mg protéine)	<i>R.A.S.</i> (cpm/mg protéine)	$\frac{R.A.S.}{A.E.S.}$
Bactéries : 10 Kc $\times$ 10 min. -10.000 g $\times$ 15 min. Activité du surnageant	0,43	72.000	166.600
123.000 g $\times$ 60 min. Activité du surnageant	0,48	49.800	104.100
Précipitation par SO_4 Smy. (Smy 2/protéines 5 ; p/p) Après 7.000 g $\times$ 10 min., le surnageant est fractionné par $SO_4(NH_4)_2$ Saturation en $SO_4(NH_4)_2$			
40%	0,16	31.500	192.000
45%	0,41	33.700	81.800
50%	1,23	26.800	21.700
55%	1,23	36.500	29.600
70%	0,16	23.000	145.500

ETAPE PRELIMINAIRE DE PURIFICATION DU 3Q-ENZYME

effectuée suivant les indications portées au chapitre I. La figure 24 donne les résultats pour les premières fractions recueillies. Avec la colonne que nous possédions alors, nous constatons que la fraction la plus riche, a une activité enzymatique qui ne dépasse pas 3,45 UI par mg de protéine, à partir d'un extrait d'activité enzymatique spécifique de 0,98, soit une purification de 3,5 fois. Il est à noter que le rapport R diminue considérablement pour les fractions les plus riches en activité enzymatique.

b.- Deuxième procédé.

Electrophorèse en veine liquide. Cinq électrophorèses ont été réalisées. A partir de solution contenant 0,75 UI par mg de protéine, on isole des fractions ayant une AES de 29,3 UI par mg de protéine. La figure 25 donne un type de séparation. Elle montre clairement, ainsi que le tableau ci-après, que les fractions les plus riches en activité enzymatique, sont les moins radioactives. Ainsi la partie ayant une activité enzymatique spécifique de 24,80 a un rapport R de 450, alors que la réunion des dernières fractions donne une solution d'activité enzymatique de 1,40 pour un rapport R de 7.820.

En résumé, si l'on pose que l'enzyme, mélangé aux protéines de l'extrait brut est caractérisé par un rapport R = 100, la fraction enzymatique la plus riche, obtenue à l'électrophorèse a un rapport R = 0,26, soit une

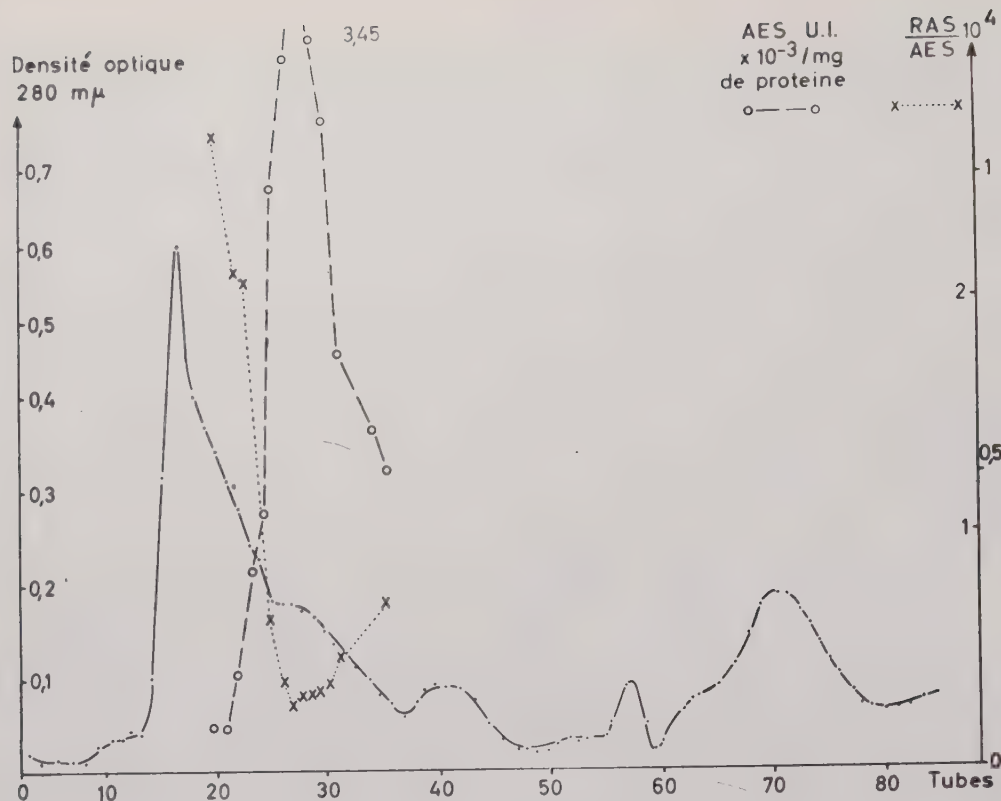
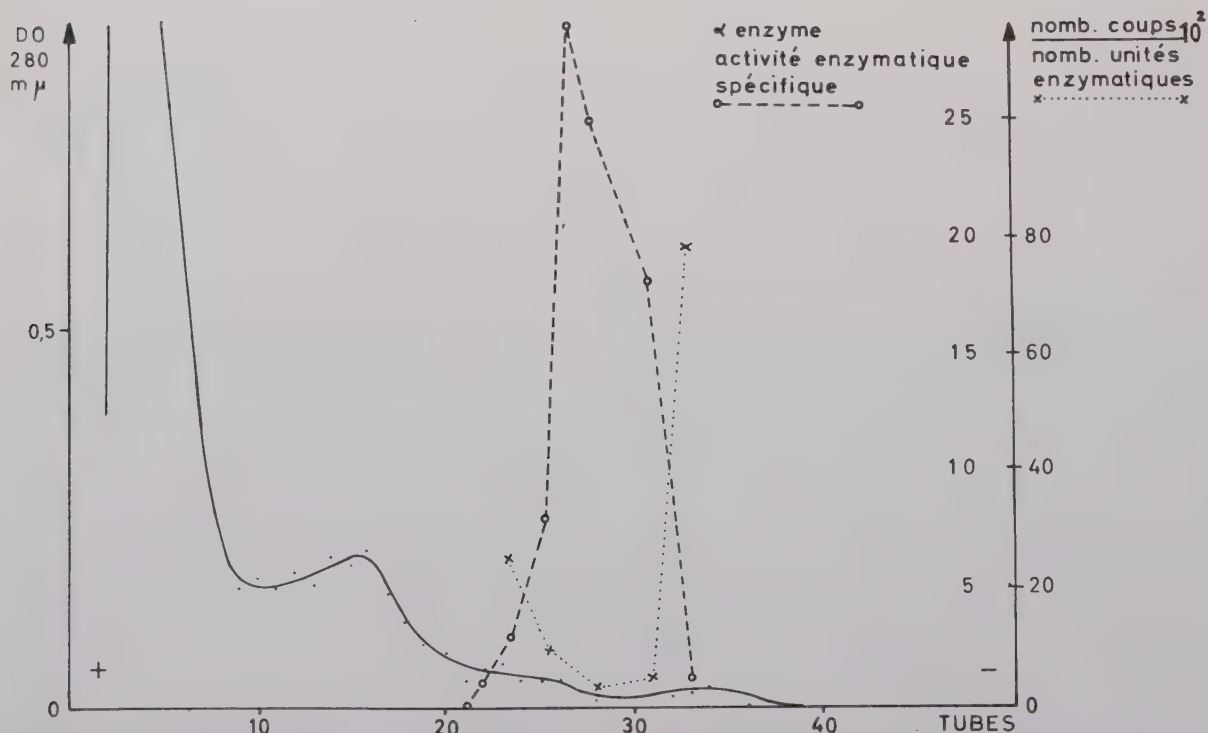


FIGURE 24



Electrophorèse des fractions précipitées entre 45 & 70 % de sulfate d'ammonium. Appareil el-phor-vap 2,5 kv, 125 mA tampon tris HCl 0,025M EDTA.: 0,001M vitesse de passage de l'échantillon 1,5 ml/h.

FIGURE 25

valeur 380 fois moins importante que celle caractérisant l'extrait brut initial. La radioactivité de la fraction 27 n'est pas portée sur le tableau ci-dessous, en raison de la concentration peu élevée en protéine ne permettant pas d'interpréter valablement le très faible marquage radioactif que nous avons obtenu.

TABLEAU 9

<i>N° des tubes</i>	<i>A E S</i>	<i>R A S</i>	$\frac{R A S}{A E S}$
23-24	3, 17	7.550	2.380
25-26	8.30	7.250	874
27	29.3		
28-29	24.80	11.150	450
30-31-32	18.17	9.500	523
33	1.40	10.950	7.820

ELECTROPHORESE EN VEINE LIQUIDE

G)- DISCUSSION DES RESULTATS.

On considère successivement les résultats en rapport avec la purification de l'enzyme, puis ceux concernant le marquage radioactif de la protéine enzymatique.

a.- MARCUS et TALALAY, en 1956, ont utilisé les stades suivants pour purifier le 3 α -enzyme : après précipitation de l'extrait brut au sulfate d'ammonium entre 45 et 55% de saturation, les acides nucléiques sont éliminés par précipitation au sulfate de protamine. Le 3 α -enzyme du surnageant est de nouveau précipité entre 40 et 50% de saturation en sulfate d'ammonium. Les protéines n'ayant pas d'activité enzymatique sont ensuite absorbées sur gel de phosphate de calcium (pH 6,5). Ces auteurs ont ainsi obtenu une activité enzymatique spécifique de 27,4 UI par mg de protéine. En 1957, HURLOCK et TALALAY ont ajouté une nouvelle étape de purification : l'addition d'acétone de -10° à -20° après la 2ème précipitation au sulfate d'ammonium. L'activité enzymatique spécifique obtenue est de 34 à 48 UI par mg de protéine.

BOYER (1964) complète la purification de ces derniers expérimentateurs. Après la précipitation de la protéine enzymatique par 40 à 60% d'acétone, il effectue une double chromatographie sur carboxy-méthyle-cellulose. Les fractions les plus riches sont soumises à une précipitation par le sulfate d'ammonium à 75% de saturation. La purification est poursuivie par une filtration sur gel de Séphadex G 100, et de nouveau par une

précipitation par le sulfate d'ammonium à 75% de saturation.

Enfin DELIN, SQUIRE et PORATH (1964), obtiennent une purification de 810 fois avec un rendement de 80%, après 4 étapes seulement (précipitation des acides nucléiques par le sulfate de streptomycine, précipitation des protéines enzymatiques par le sulfate d'ammonium, filtration sur gel de Séphadex G 100 et électrophorèse de zone à pH 8,2). L'activité enzymatique spécifique obtenue est de 197,7 UI par mg de protéine. La pureté de l'enzyme a été contrôlée par électrophorèse en disque.

La fraction enzymatique la plus riche que nous avons obtenue en 3 étapes peut donc être considérée comme pure à 14,8%. Notre séparation, qui a été effectuée en 1964, est donc très partielle. Nous ne rapportons pas de valeur de rendement au cours de ces différentes étapes, car seules les fractions les plus riches en activité enzymatique ont été utilisées, les autres, plus contaminées en protéines marquées, ayant été écartées. Il reste à montrer si le degré de purification obtenu permet de tirer des conclusions sur l'origine des constituants formant l'enzyme.

b.- Dans leur travail, HOGNESS, COHN et MONOD ont réalisé le marquage des protéines non-enzymatiques dans une culture devant secondairement produire 3 taux différents d'enzyme (cultures A, B, C). Deux témoins ont été également effectués : d'une part un enzyme pleinement marqué, obtenu par induction dans un milieu radioactif, d'autre part un enzyme non marqué, incorporé volontairement à des protéines radioactives. L'isolement terminal de la protéine enzymatique a été effectué sous forme de précipité avec le sérum anti β -galactosidase correspondant.

Les principaux résultats sont les suivants :

TABLEAU 10

	% d'enzyme par rapport à un extrait pleinement induit	$R = \frac{\text{Radioactivité}}{\text{Activité enzymatique}}$		
		extrait brut	extrait purifié	précipité
Extrait A	4,8	78	2,1	0,0050
Extrait B	32	19,1	0,52	0,0043
Extrait C	58	7,0	0,118	0,00072
Extrait avec enzyme pleinement induit et totalement marqué	100	10,9	0,66	0,45
Mélange : enzyme non marqué avec extrait marqué		10,4	0,27	0,0019

On voit que les extraits très purs A, B ou C, obtenus par précipitation sont 4.500 à 15.000 fois moins marqués que l'extrait brut. Ces mêmes

extraits sont 90 à 620 fois moins radioactifs que celui obtenu avec l'enzyme pleinement marqué.

ROTMAN et SPIEGELMAN aboutissent à des résultats similaires en utilisant le carbone C^{14} : moins de 1% du carbone de l'enzyme nouvellement formé provient d'un carbone préexistant dans la cellule.

Dans notre expérience, l'extrait purifié à 14,8% est 380 fois moins marqué que l'extrait brut initial. On peut concevoir qu'un extrait dont la pureté approcherait 100% soit 2.000 à 3.000 fois moins radioactif, ce qui nous rapproche de l'ordre de grandeur obtenu par MONOD et coll. Malgré les imperfections de notre purification, il n'est pas déraisonnable de penser que l'enzyme 3 α s'est bien formé à partir de constituants puisés à l'extérieur de la cellule au moment où l'on ajoute l'inducteur.

o
o o

III. RESUME DU CHAPITRE III

Nous rapportons ici quelques essais contribuant à démontrer la nature réellement induite du 3 α -enzyme.

Les cultures en l'absence d'inducteur ou en présence de testostérone 0,3 m M et de concentration de chloramphénicol inhibant les synthèses protéiques, donnent des bactéries dont les extraits ne dépassent pas l'activité enzymatique spécifique de 2 à 3.10⁻³ UI par mg de protéine.

Bien que les essais précédents montrent avec suffisamment de netteté la nature induite de l'enzyme, nous avons utilisé un troisième critère : à partir du moment où l'on ajoute l'inducteur, l'enzyme doit se former aux dépens de constituants puisés dans le milieu de culture, et non par remaniement d'un précurseur intracellulaire. Nous avons donc, dans un premier temps, selon le protocole de HOGNESS, marqué uniformément par le soufre S³⁵ les protéines bactériennes synthétisées en phase de croissance exponentielle dans un milieu contenant comme seule source de soufre la cystéine S³⁵; dans un deuxième temps, nous avons obtenu à partir de ces mêmes bactéries une deuxième phase de croissance exponentielle par culture dans un milieu neuf non marqué et en présence de l'inducteur choisi, la testostérone 8.10⁻⁴ M, de manière à susciter la production d'enzyme. En raison du faible taux de croissance sur ce milieu, les bactéries ne sont recueillies qu'après 40 heures de contact avec le stérol alors qu'elles se trouvent en fin de phase exponentielle. L'enzyme induit dans ces conditions ne doit pratiquement pas porter d'activité radioactive. Le marquage de l'enzyme a été suivi par l'étude du rapport :

$$R = \frac{\text{radioactivité spécifique}}{\text{activité enzymatique spécifique}}$$

à chaque étape de la purification. Après précipitation des acides nucléiques et isolement de la protéine enzymatique par le sulfate d'ammonium le rapport diminue de 166.000 (extrait brut) à 21.700 (fraction précipitée entre 45 et 50% de sulfate d'ammonium). Il s'abaisse à 1.000 pour les fractions les plus riches en activité enzymatique obtenues par filtration sur gel de Séphadex G 100, pour être de 450 pour les parties les mieux isolées par électrophorèse en veine liquide. Malgré les imperfections de

la purification (la protéine ne peut être considérée comme pure qu'à 14,8%) on peut penser que l'enzyme s'est bien formé à partir de constituants puisés dans le milieu extérieur.

o
o o

C H A P I T R E I V

STRUCTURES ET FONCTIONS
INDISPENSABLES A LA MANIFESTATION
DE L'EFFET INDUCTEUR.

STRUCTURES ET FONCTIONS INDISPENSABLES A LA MANIFESTATION DE L'EFFET INDUCTEUR.

La testostérone est l'inducteur type de l'enzyme 3 α -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase de *Pseudomonas testosteroni*. Deux autres structures ont été signalées comme susceptibles de faire apparaître l'enzyme : la déhydro-épiandrostérone et le 3,17 dioxo-androsta, 4-ène (MARCUS et TALALAY, 1956). Pour obtenir des bactéries riches en activité enzymatique, TALALAY emploie maintenant la progestérone à la place de la testostérone (BOYER, 1964). Enfin WACKER et DREWS (1965) étudient l'effet inducteur de 9 stéroïdes pour la Δ^5 -3 cétostéroïde isomérase, mais nous n'avons pas eu connaissance de résultat concernant les structures et les fonctions indispensables que doit posséder l'inducteur pour faire apparaître le 3 α -enzyme. Nous avons donc entrepris des investigations dans ce sens, en espérant également trouver un inducteur gratuit, constitué par une structure provoquant la formation d'enzyme tout en n'étant pas métabolisé par *Ps. testosteroni*.

I.- CONDITIONS DE CULTURE.

Elles ont été précisées dans le chapitre II. Nous insisterons cependant sur quatre points :

- A.- Le stéroïde testé doit être le seul stéroïde contenu dans le milieu de culture. On a donc toujours vérifié sa pureté par chromatographie sur couche mince.
- B.- Le stéroïde doit être ajouté en quantité suffisante, et cette quantité doit être entièrement soluble. Cette condition est indispensable à réaliser pour l'interprétation des résultats concernant le taux d'enzyme obtenu. L'addition de 0,35 mMole nous a semblé nécessaire et suffisante. Dans certains cas nous avons favorisé la solubilisation par chauffage du milieu de culture à 60° pendant 14 heures, en nous assurant secondairement que le stérol n'avait pas été transformé.

Dans quelques cas (composés XX à XXIII, XXV à XXVIII, XXX à XXXII XXXIX, XLII, XLIII) nous avons ajouté de l'albumine humaine (concentration 6‰), isolée des autres protéines sériques par fractionnement à

l'éthanol selon le procédé de COHN. Cet albumine, exempt de stérol, permet une bonne solubilisation de la substance à tester. Cette action avait déjà été montrée en 1954 par BISCHOFF, puis par SCHELLMAN pour l'albumine sérique d'origine bovine, mais le pouvoir solubilisant serait encore plus efficace avec la sérum-albumine humaine (WESTPHAL, 1961). Il a été prouvé par ailleurs que la quantité de stéroïde réellement "liée" à la sérum-albumine peut être considérée comme négligeable (PEARLMAN et CREPY, 1967 - FOSSET et CRASTES de PAULET, 1967). Tout le stérol ajouté peut donc être considéré comme disponible pour l'effet inducteur. Malgré ces moyens utilisés pour solubiliser les stéroïdes, nous avons éliminé un certain nombre de substrats saturés ne possédant qu'une seule fonction oxygénée; leur concentration dans le milieu de culture est en effet trop faible. Sur 59 produits testés nous rapportons donc seulement 37 résultats.

C.- La concentration en stéroïde doit rester constante durant le processus d'induction. Ceci a été vérifié : en effet les métabolites du stérol n'apparaissent que lorsque l'enzyme 3 α est déjà présent.

D.- Le contrôle de cette concentration est effectué par spectrophotométrie chaque fois que cela est possible. Après extraction d'un volume connu de milieu par l'acétate d'éthyle ou le chloroforme, suivant la technique précisée au chapitre I, le résidu obtenu après évaporation est repris dans l'éthanol. On a évité d'utiliser le chloroforme comme solvant, en raison de son absorption en dessous de 240 m μ , même lorsque "cuve-témoin" et "cuve-réaction" contiennent toutes deux ce même produit. De même on n'a pas ajouté de chloramphénicol aux prélèvements devant servir aux dosages de stéroïdes. En effet, cet antibiotique est extractible dans les conditions que nous utilisons, et son absorption est maximum à la longueur d'onde de 278 m μ avec un coefficient d'absorption moléculaire de 298. Le calcul de la concentration en stéroïde est effectué en utilisant la loi de BEER-LAMBERT :

$$D_0 = \epsilon \cdot l \cdot c$$

DO = densité optique de la solution à la longueur d'onde d'absorption maximum.

l = trajet optique en centimètre

c = concentration du stéroïde en molécule gramme par litre.

ϵ = coefficient d'extinction moléculaire du stéroïde.

Le tableau 11 donne les longueurs d'onde pour lesquelles l'absorption est maximum, ainsi que le coefficient d'extinction moléculaire. Nous avons déterminé certaines valeurs que nous n'avons pas retrouvées dans la littérature. La figure 26 donne le spectre pour deux oestra-triènes (solvant éthanol).

ABSORPTION MAXIMUM
DANS L'ETHANOL

	d'après la littérature		trouvé
	Longueur d'onde	Coefficient d'absorption moléculaire	
$C_{21}H_{30}O_2^{xx}$ 3,20-dioxo, préigna, 4-ène XXXVI (progestérone)	241	17.000	240
$C_{20}H_{30}O_2$ 17 β -hydroxy, 3-oxo, 17 α -méthyle, androsta, 4-ène XXXIV (17 α -méthyle testostérone)			240
$C_{19}H_{28}O_2^{xx}$ 3 β -hydroxy, 17-oxo, androsta, 5-(6)-ène VIII (déhydro-épiandrosterone)	292	45	
$C_{19}H_{28}O_2^x$ 17 β -hydroxy, 3-oxo, androsta, 4-ène I (testostérone)	241	15.800	240
$C_{19}H_{28}O_2$ 17 β -hydroxy, 3-oxo, 8-9 β androsta, 4-ène XLIX (rétro-testostérone)			240,5
$C_{19}H_{26}O_2^x$ 17 β -hydroxy, 3-oxo, androsta, 1,4-diène IV	243	16.100	242
$C_{19}H_{26}O_2^x$ 3,17-dioxo, androsta, 4-ène II	240	17.170	238
$C_{19}H_{24}O_2^x$ 3,17-dioxo, androsta, 1,4-diène III	244	17.000	243
$C_{18}H_{26}O_2^x$ 17 β -hydroxy, 3-oxo, oestra, 4-ène XIV (19-nor testostérone)	241	17.000	240
$C_{18}H_{24}O_2^x$ 3,17 β -dihydroxy, oestra, 1,3,5(10)-triène XX (17 β -oestradiol)	280	2.000	280
$C_{18}H_{24}O_2$ 17 β -hydroxy, 3-oxo, oestra, 4,9(10)11-triène XIX			335

x SCOTT

xx DORFMAN

TABLEAU 11

BECKMAN

PROMESUR 23, rue Clapeyron PARIS

EUR. 59-55

N°12977

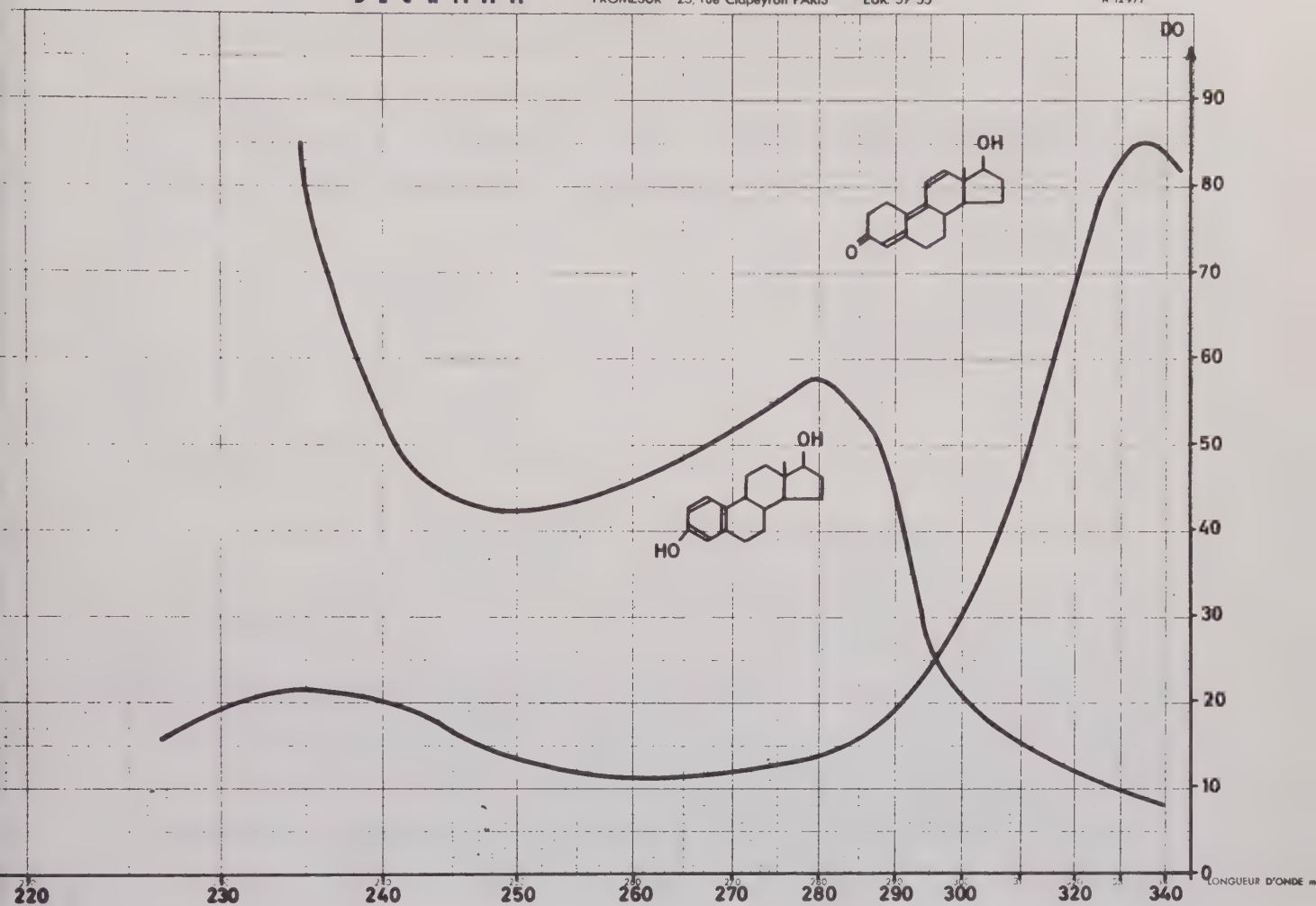


Figure 26

II.- ETUDE DES RAPPORTS STEROÏDE-BACTERIE.

Ces rapports peuvent être vus sous trois aspects : action du stéroïde sur la croissance bactérienne, sur la production d'enzyme, et action de la bactérie sur le stéroïde.

Le deuxième aspect est le plus important et constitue l'essentiel de ce chapitre. Pour l'apprécier nous n'avons pas calculé le taux différentiel de synthèse (MONOD, 1952), mais effectué une mesure relative. Pour cela nous ajoutons (temps 0) au milieu de culture contenant le stéroïde et dont on recherche l'effet inducteur, un inoculum bactérien important, en phase exponentielle (concentration finale $1,2 \cdot 10^8$ bactéries par ml). On effectue *simultanément* la même opération sur le stérol inducteur de référence, la testostérone. 3 et 6 heures après, on prélève une quantité suffisante de culture pour doser dans les bactéries l'activité du 3α -enzyme. L'appréciation du pouvoir inducteur du stéroïde est donnée par le rapport:

$$I = \frac{\text{AES (culture en présence de stéroïde)}}{\text{AES (culture en présence de testostérone)}}$$

Un composé caractérisé par une valeur de I inférieure à 1 aura donc un pouvoir inducteur inférieur à celui de la testostérone. Du point de vue pratique, les stéroïdes sont testés par groupe de 6 et pour chaque groupe une culture de référence est effectuée avec la testostérone comme inducteur. Il en est de même si l'on incorpore de la sérum-albumine.

L'action de la bactérie sur le stéroïde est étudiée par chromatographie de 100 μ g d'extrait sec sur couche mince de gel de silice.

III.- RESULTATS.

Ils seront groupés suivant les 3 effets signalés précédemment :

A.- Action du stéroïde sur la croissance.

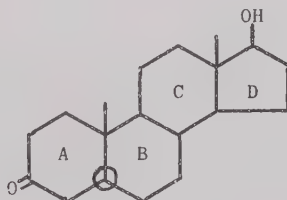
Nous n'avons jamais noté d'effet marqué sur la courbe de croissance, à la concentration utilisée. Cependant il est à noter que les mesures de densité optique ne peuvent être réalisées lorsque la culture est effectuée en présence de sérum-albumine, par suite de la formation d'agrégats bactériens dans le milieu.

B.- Action du stéroïde sur l'apparition de l'enzyme 3α .

a)- Comparaison de l'effet inducteur 6 heures après le contact avec le stéroïde.

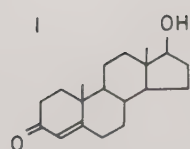
L'effet de ces substances sur la croissance de *Ps. testosteroni* étant considéré comme nul, les valeurs de I peuvent être comparées d'un stéroïde à un autre. Les tableaux 12 à 21 rassemblent ces résultats (MICHEL-BRIAND, 1966a - CRASTES DE PAULET, 1966).

1. Effet des métabolites de la testostérone (tableau 12). On ne constate pas de différences notables dans le pouvoir inducteur. Nous avons arbitrairement rattaché à ces produits la structure V bien qu'elle n'ait pas été encore identifiée dans les cultures de *Ps. testosteroni*. Mais son existence paraît très probable. Elle a été en effet isolée (avec une fonction cétone sur le cycle à 5 carbones) dans les cultures de *Nocardia restrictus* (SIH, 1966) et également dans des cultures d'autres microorganismes. Cette structure V n'a aucun effet inducteur.
2. Stéroïdes dérivés du noyau 5 α -androstane (tableau 13). Tous ces produits sont de bons inducteurs. Seul le produit VI possédant une fonction hydroxyle orientée en 3 α est moins efficace. D'après les deux tableaux précédents la structure minimum requise pour qu'il y ait effet inducteur correspond à un dérivé du noyau 5 α -androstane où il y aurait deux fonctions oxygénées accessibles l'une sur le cycle A, l'autre sur le cycle D.

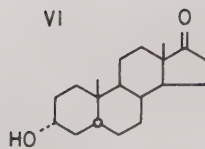


Nous allons donc explorer le rôle des groupements caractéristiques de ce noyau ainsi que celui des configurations au niveau des cycles A et D.

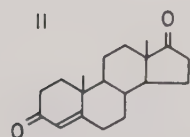
3. Influence du méthyle en C₁₉ (tableau 14). Le rôle de ce radical paraît de première importance. Son absence diminue de 10 fois le pouvoir inducteur du composé XI. L'action est moins nette sur la testostérone (XIII) et ininterprétable sur le produit XV qui est peu inducteur par lui-même. Il est à noter que l'encombrement en C₁₁ diminue notablement la faculté de susciter l'enzyme (cortisone, WACKER, 1965).
4. Influence de la saturation du noyau A (tableaux 15 et 16). On a vu que les dérivés de la testostérone avaient un pouvoir inducteur



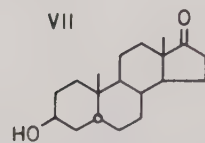
I = 1,00



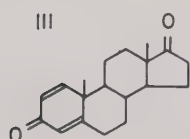
I = 0,25



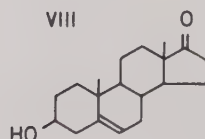
I = 1,08



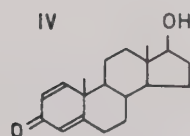
I = 0,56



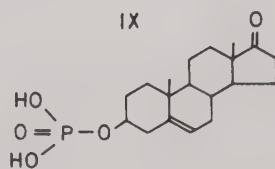
I = 0,78



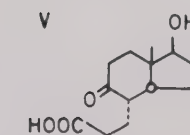
I = 1,07



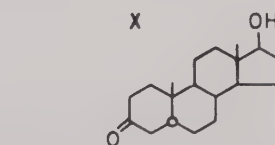
I = 0,70



I = 0,86



I = 0,03



I = 0,73

Tableaux 12 et 13

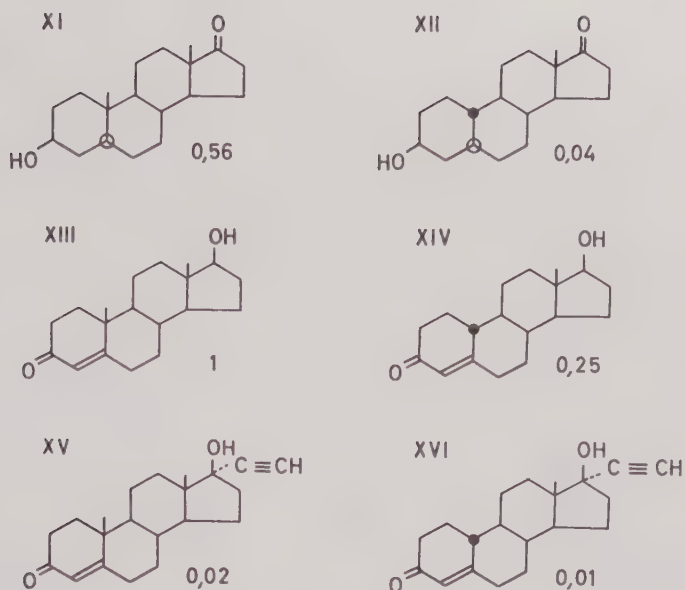
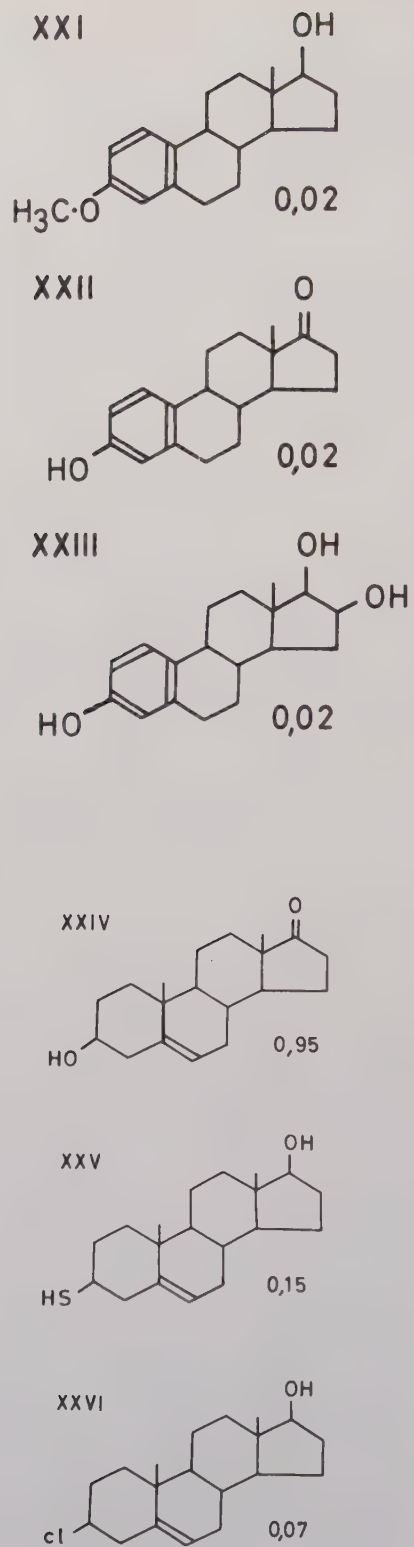
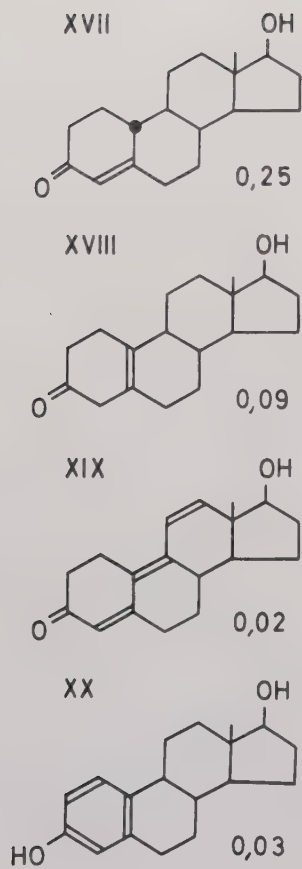


TABLEAU 14

voisin : la présence de deux doubles liaisons (composé IV) ne modifie pas le pouvoir inducteur du composé saturé correspondant (composé X). Aussi la diminution du pouvoir inducteur accompagnant l'insaturation totale du noyau A, sous forme de noyau benzénique est essentiellement due à l'absence du méthyle en C₁₉. La seule différence notable entre ces dérivés 19 nor, est celle existant entre le composé XVII (I = 0,25) et XVIII (I = 0,09) : elle pourrait s'expliquer par la réactivité plus grande du carbonyle en C₃ conjugué avec une double liaison C₄-C₅.

5. Influence d'une fonction oxygénée en C₃ (tableau 17). Les trois composés XXIV, XXV, XXVI peuvent être comparés entre eux. En effet on a démontré (tableau 12) que le remplacement d'une fonction cétone par une fonction hydroxyle en C₁₇ n'avait aucune incidence sur le pouvoir inducteur. De l'examen du tableau 17, il résulte que le rôle de la fonction oxygénée en C₃ semble indispensable à la manifestation de l'effet inducteur, et que le remplacement par une fonction thiol, de réactivité chimique voisine, supprime pratiquement tout pouvoir inducteur.
6. L'ensemble de ces résultats montre l'importance du méthyle en C₁₉ et de la fonction oxygénée en C₃. Le tableau 18 apporte quelques précisions. Le faible pouvoir inducteur des composés XXVII et



Tableaux 15 - 16 - 17

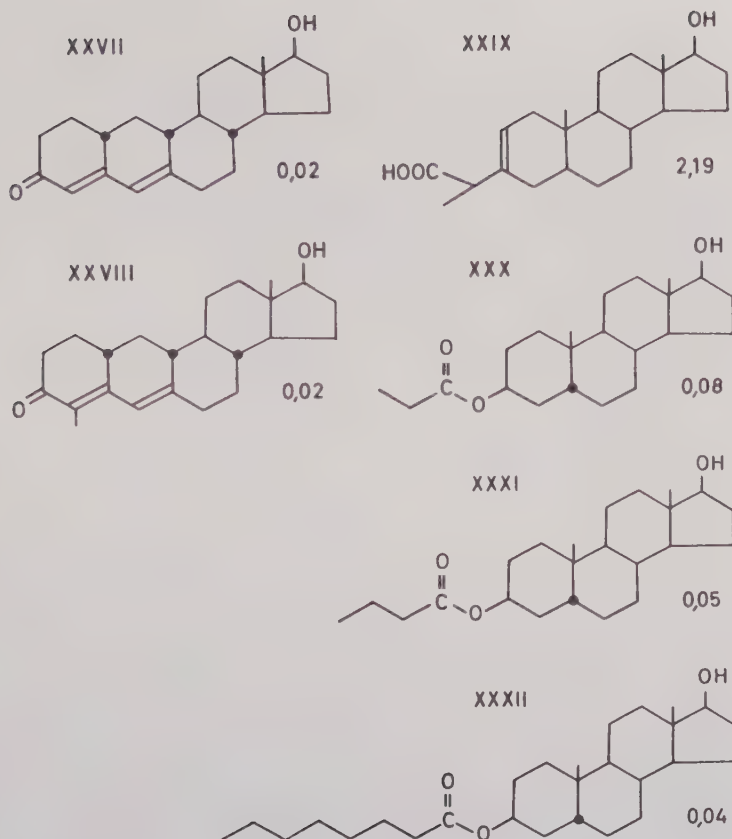


TABLEAU 18

XXVIII provient autant de l'absence d'un groupement méthyle angulaire que de l'allongement de la molécule de stéroïde. En effet, le composé XXIX avec un radical iso-propyle-acide a un encombrement voisin, mais possède un groupement méthyle en C₁₉ : c'est un excellent inducteur. L'allongement de la molécule n'est cependant pas indifférent : les composés XXXI et XXXII sont pratiquement dépourvus de pouvoir inducteur.

La comparaison des activités des composés XXIX et XXX montre également que l'accessibilité de la fonction oxygénée est importante : ce qui expliquerait le rôle particulièrement inducteur du composé XXIX.

7. Cette notion se retrouve également au niveau du cycle D. On ne peut pas tester valablement des composés ne possédant qu'une fonction oxygénée en C₃, en raison de leur insolubilité. Mais l'encombre-

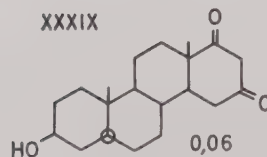
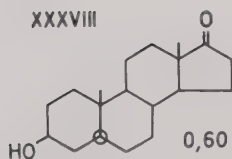
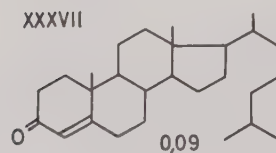
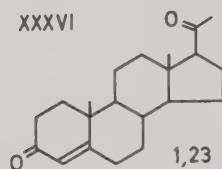
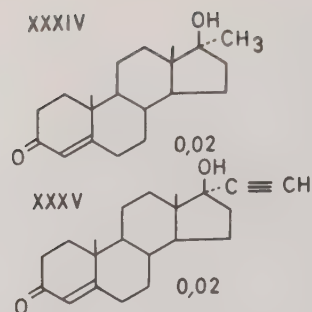
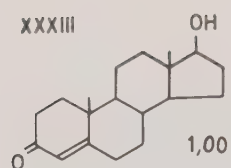
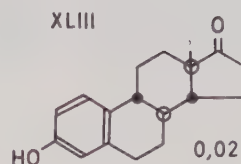
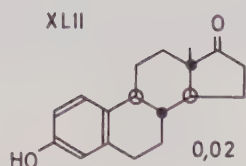
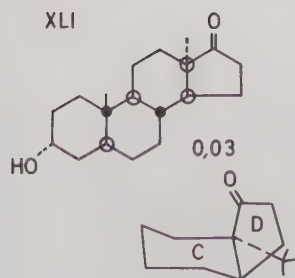
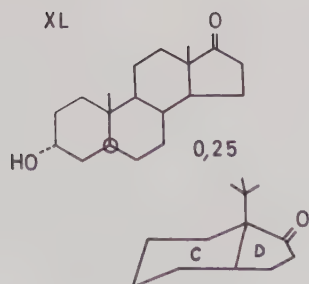


TABLEAU 19

ment de la fonction hydroxyle au niveau du carbone C_{17} (composé XXXIV, tableau 19) est accompagné d'une diminution considérable du pouvoir inducteur, alors que si la fonction cétone est mise en relief (composé XXXVI) on restaure totalement ce pouvoir. La faible action de XXXIX est d'interprétation plus difficile.

8. Influence d'un groupement méthyle en C_{20} (tableau 20 et figure 27). Ici aussi la présence d'un méthyle en C_{20} est déterminante dans l'effet inducteur. Seule la comparaison des composés XL et XLI est significative. On ne peut toutefois éliminer l'effet d'une légère distorsion entre les cycles C et D.
9. Après l'étude de l'influence de l'encombrement et de la configuration, le rôle de la conformation dans le pouvoir inducteur est donné dans le tableau 21 et la figure 28. La comparaison des effets des composés 5 α (XLIV) et 5 β (XLV) ne montre pas d'influence de la



TABEAU 20

conformation des cycles A et B. La conformation entre les cycles B et C (XLVIII et XLIX) a un effet plus net, encore que la diminution de l'effet inducteur dans XLIX puisse être due à l'inaccessibilité du groupement méthyle en C_{19} , situé au niveau de la face α .

10. Conclusion sur ces résultats : lorsque l'on part d'une molécule de type stéroïde, les structures qui apparaissent comme indispensables à la manifestation de l'effet inducteur sont par ordre d'importance décroissante :

- un groupement méthyle en C_{19} et en C_{20} ,
- une fonction oxygénée située sur le noyau A et facilement accessible. Il en est de même pour le cycle D.
- une planéité des cycles A, B et C et le non encombrement de la face α .

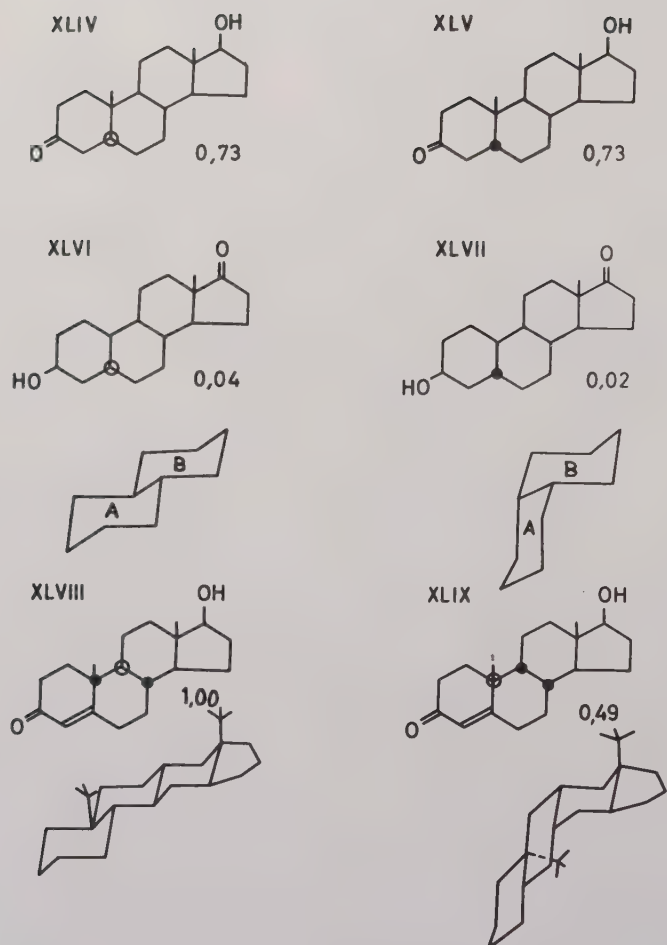


Tableau 21

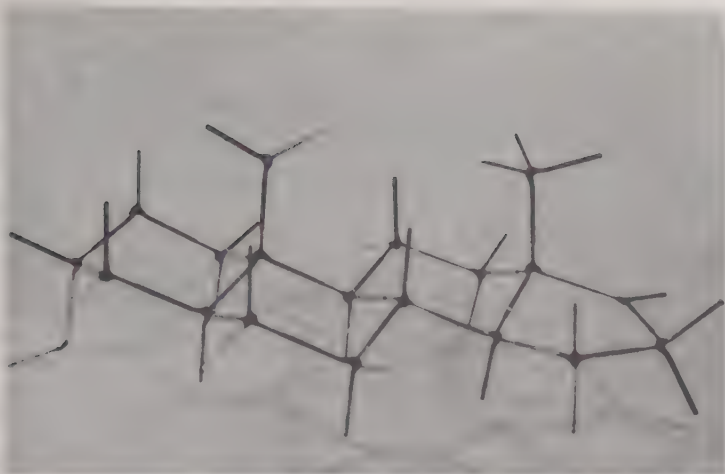


Figure 27

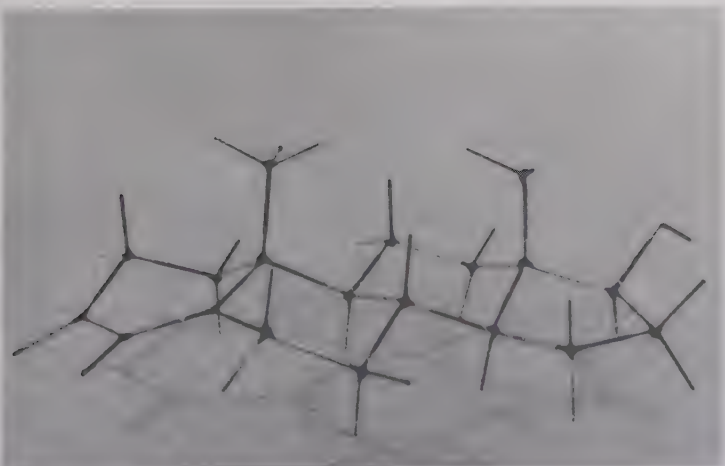
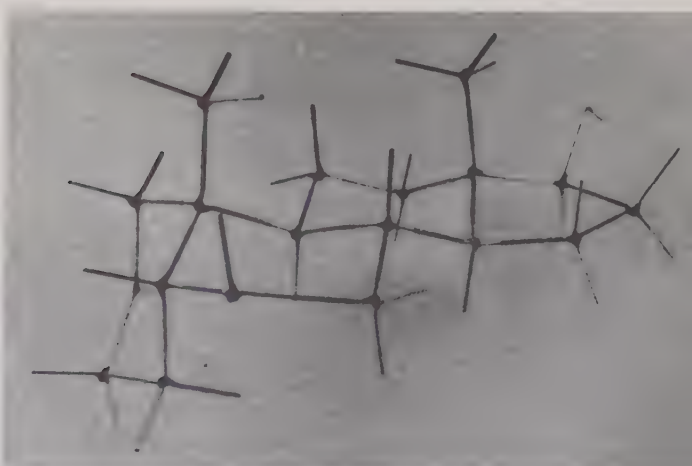


Figure 28

b) - Cinétique d'apparition de l'enzyme.

Nous avons toujours effectué deux prélèvements pour dosage enzymatique. Le premier après 3 heures de contact avec l'inducteur, le second après 6 heures. Nous n'avons jamais observé de production d'enzyme dans les bactéries lors du premier prélèvement.

Dans certains cas, nous avons pu faire une cinétique précise d'apparition de l'enzyme (stéroïdes I, II, III, IV - cf. chapitre III; VIII, IX, XIV, XXIX). Les résultats sont toujours identiques; les figures 29 et 30 donnent un exemple avec les composés VIII et XXIX. Ce retard de l'apparition de l'enzyme 3 α est donc retrouvé avec tous les stéroïdes que nous avons testés, et nous verrons dans les chapitres V et VI l'explication que l'on peut en donner.

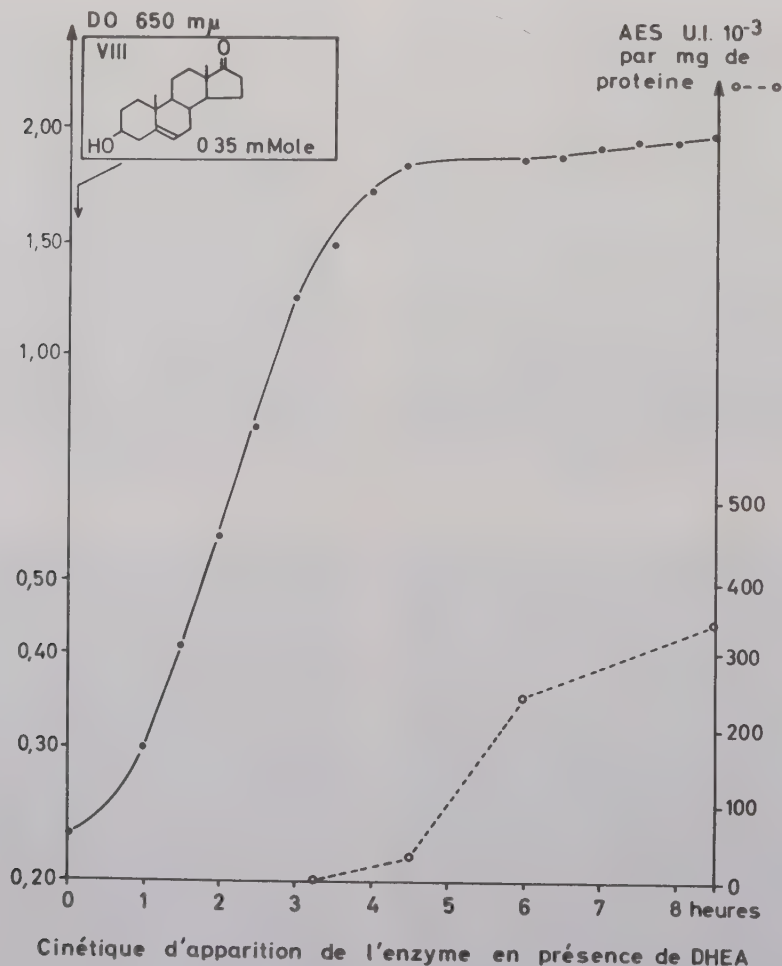


FIGURE 29

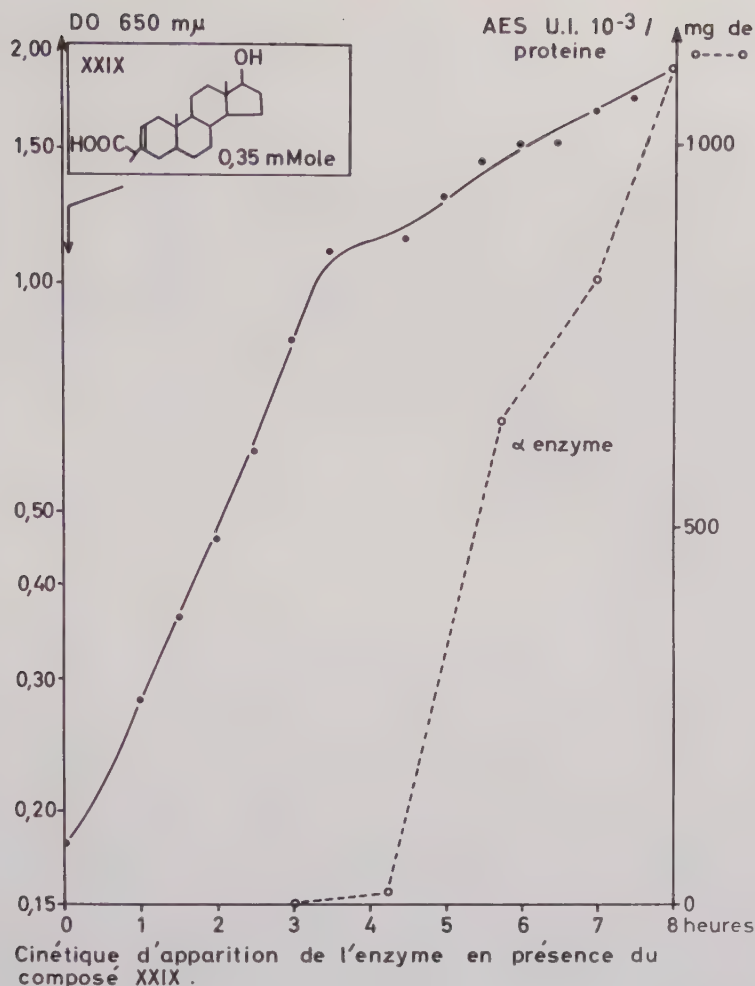


FIGURE 30

C. - Action de la bactérie sur le stéroïde.

Le tableau 22 présente quelques stéroïdes classés par pouvoir inducteur décroissant et dont on a simplement signalé le nombre de dérivés trouvés après chromatographie sur couche mince sans que nous ayons identifié ces produits. On remarque que quelque soit le pouvoir inducteur, il y a toujours (sauf dans deux cas) formation de métabolites. Ces résultats prouvent :

a. Que l'on n'a pas trouvé d'inducteur gratuit au sens strict du terme.

Mais la spécificité d'action de l'enzyme 3α pour la réduction du radical 3α-OH a déjà été démontrée; les différentes structures essayées (sauf VI) sont donc des inducteurs non métabolisés par l'enzyme qu'elles ont induit.

b. Que les stéroïdes testés induisent certainement d'autres enzymes que le

NATURE DU STEROL	Après 6 h de contact avec le stérol	
	Nombre de produits obtenus	Pouvoir inducteur
17 β -hydroxy, 3-isopropyle acide, androsta, 2-ène XXIX	X	2,19
3,20-dioxo, pregna, 4-ène XXXVI	3	1,23
3,17-dioxo, androsta, 4-ène II	4	1,08
3 β -hydroxy, 17-oxo, androsta, 5(6)-ène VIII	3	1,07
17 β -hydroxy, 3-oxo, androsta, 4-ène I	4	1,00
3,17-dioxo, androsta, 1,4-diène III	4	0,78
17 β -hydroxy, 3-oxo, 5 β -androstane XLV	4	0,73
17 β -hydroxy, 3-oxo, 5 α -androstane XLIV	3	0,73
17 β -hydroxy, 3-oxo, androsta, 1,4-diène IV	3	0,70
3 β -hydroxy, 17-oxo, 5 α -androstane VII	5	0,56
17 β -hydroxy, 3-oxo, 8,9 β -androsta, 4-ène XLIX	1	0,49
17 β -hydroxy, 3-oxo, oestra, 4-ène XVII	1	0,25
3-oxo, cholesta, 4-ène XXXVII	0	0,09
3 β -hydroxy, 17-oxo, 5 α -oestrane XII	3	0,04
3,17 β -dihydroxy, oestra, 1,3,5(10)-triène XX	2	0,03
17 β -hydroxy, 3-oxo, 17 α -méthyle, androsta, 4-ène XXXIV	1	0,02
17 β -hydroxy, 3-oxo, oestra, 4,9(10)11-triène XIX	1	0,02
17 β -hydroxy, 3-oxo, 17 α -éthynyle, oestra, 4-ène XVI	0	0,01

TABLEAU 22

3 α -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase. On comprend en effet difficilement que la même bactérie puisse posséder d'emblée un nombre d'enzymes constitutifs aussi variés que celui permettant la dégradation de ces composés; cette induction multiple est possible puisque l'on sait que la testostérone provoque la formation d'au moins 6 enzymes de spécificité totalement différente.

c. Que des produits très faiblement inducteurs comme XLVI (I = 0,04 pour le 3 α -enzyme) doivent être cependant de bons inducteurs pour d'autres enzymes (formation de trois métabolites).

IV.- DISCUSSION DES RESULTATS.

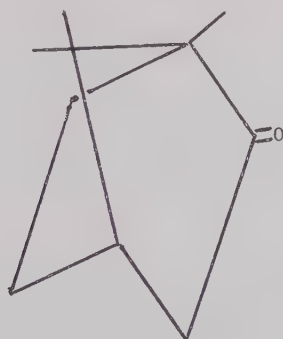
En se référant aux données de la littérature sur le rôle des stéroïdes en tant que substrat et en les comparant à nos résultats, on peut noter que les meilleures structures inductrices de l'enzyme ne sont pas obligatoirement les meilleurs substrats. On retrouve avec le 3 α -enzyme des conclusions énoncées en 1951 pour la β -galactosidase (MONOD, COHEN-BAZIRE). Le rôle des structures et des fonctions dans l'apparition de l'enzyme 3 α sera discuté plus longuement.

Nos résultats montrent que la présence d'un groupement méthyle en C₁₉ paraît absolument indispensable pour susciter la formation d'enzyme. La

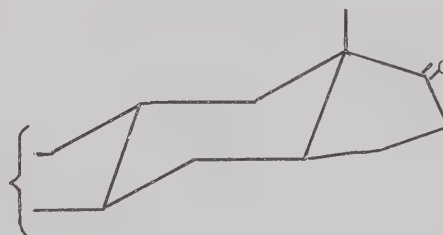
présence d'une fonction oxygénée accessible sur le cycle A et sur le cycle D ainsi que la planéité de la molécule sont également nécessaires.

Certaines de nos conclusions ne sont pas en accord avec celles données par WACKER (1965) pour la Δ^5 -3 cétostéroïde isomérase : cet enzyme est assez fortement induit par la 17 α -méthyle testostérone XXXIV alors que le 3 α -enzyme ne l'est pas. Nous avons cependant vérifié ce fait également avec le composé XXXV. D'autre part, si nous comparons nos résultats avec ceux obtenus sur le rôle de différents stéroïls dans l'induction de la Δ^1 -déshydrogénase de *Nocardia restrictus* (SIH, 1962), on constate que le seul dérivé 19-nor testé (3-oxo, 17 α -éthynyle, oestra, 4-ène) a un pouvoir inducteur pratiquement nul. Par contre la testostérone et ses dérivés sont peu actifs (AES comprise entre 18 et 55). La progestérone est le meilleur inducteur parmi ceux testés (AES = 130), mais la seule présence d'une double liaison en C₁C₂ diminue notablement cet effet (AES = 24).

On ne retrouve pas la spécificité stricte de configuration entre les différents inducteurs du 3 α -enzyme, comme celle qui existe entre les différents substrats de ce même enzyme. Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par la brève note de JACOBSON et coll. (1964). Ces auteurs partent du fait que le camphre et les 17 céto-stéroïdes présentent une analogie structurale :



Camphre



17-céto-stéroïde

Or ces deux substances induisent non seulement un céto-terpène-lactonase chez *Pseudomonas testosteroni*, mais peut-être également des hydroxystéroïde-déshydrogénases, puisque "la préinduction avec le camphre augmente le taux du métabolisme des stéroïdes par les cellules entières". Si ces faits se confirment, ils montreraient que l'effet inducteur est plus lié à certaines configurations (méthyle et fonction cétone accessibles) qu'à la présence des quatre cycles caractéristiques de la molécule stéroïde. Nous ne pensons pas qu'ils enlèvent de l'intérêt à l'étude du pouvoir inducteur des différents substrats que nous avons testés. Ils rendent

à notre avis plus compréhensible le phénomène de l'induction par ces stéroïdes, qui ne doivent pas être retrouvés fréquemment par la bactérie dans des conditions naturelles.

V.- RESUME DU CHAPITRE IV.

L'étude des structures et fonctions indispensables à la manifestation de l'effet inducteur n'a de signification que si la structure testée est en quantité suffisante dans le milieu de culture, tout en étant totalement soluble, et que si la concentration ne varie pas au cours du processus de l'induction.

Le pouvoir inducteur d'un stéroïde est défini par le rapport :

$$I = \frac{\text{activité enzymatique spécifique (culture en présence de stéroïde)}}{\text{activité enzymatique spécifique (culture en présence de testostérone)}}$$

après 6 heures de contact avec l'inducteur. La testostérone a été choisie comme stérol de référence.

Les essais d'induction avec les dérivés du noyau 5 α -androstane montrent le rôle de cette structure ainsi que des configurations au niveau des cycles A et D.

Nos résultats mettent en évidence que la présence d'un radical méthyle en C₁₉ à la jonction des cycles A et B est absolument indispensable à la manifestation de l'effet inducteur (I = 0,25 pour la 19-nor testostérone) alors que la saturation du noyau A n'a qu'un rôle secondaire. La présence d'une fonction oxygénée facilement accessible est nécessaire et ne peut pas être remplacée par un groupement thiol.

Au niveau du cycle D, l'importance d'un groupement méthyle en C₂₀ à la jonction des cycles C et D, ainsi que l'accessibilité d'une fonction oxygénée sont des facteurs importants.

Enfin la conformation des cycles A et B (A-B cis ou A-B trans) semble avoir moins de valeur bien que la planéité de l'ensemble A, B, C et le non encombrement de la face α située au-dessous de ce plan soient souhaitables.

L'étude qualitative des produits formés à partir de ces stéroïdes met en évidence que toutes les structures inductrices sont métabolisées : on n'a donc pas trouvé d'inducteur gratuit du 3 α -enzyme, au sens strict du terme.

C H A P I T R E V

TEMPS DE LATENCE D'APPARITION DE L'ENZYME

3 α -HYDROXYSTEROIDE : NAD-OXYDOREDUCTASE

ROLE DE DIFFERENTS FACTEURS

TEMPS DE LATENCE D'APPARITION DE L'ENZYME
3 α -HYDROXYSTEROÏDE : NAD-OXYDOREDUCTASE
ROLE DE DIFFERENTS FACTEURS

Lorsque l'on recherche la production d'enzyme 3 α par *Pseudomonas testosteronei*, après addition de testostérone à une culture en phase exponentielle, on constate que l'enzyme n'apparaît qu'après plusieurs heures. Nous appellerons ce phénomène "temps de latence d'apparition de l'enzyme".

I.- REALITE DU TEMPS DE LATENCE D'APPARITION DE L'ENZYME; HYPOTHESES SUR
L'ORIGINE DE CE RETARD.

MARCUS et TALALAY, en 1956, ont noté que sur un milieu à l'extrait de levure, la "formation d'enzyme adaptative était toujours retardée de 6 à 8 heures après addition du stéroïde, même si un inoculum adapté est utilisé. Ceci est vrai, que le stéroïde soit ajouté initialement ou à n'importe quelle heure durant les 24 heures suivant l'inoculation". Nous avons vérifié les faits de la première proposition de très nombreuses fois et bien qu'ils aient été signalés par d'autres auteurs, aucune explication n'a été fournie jusqu'à présent. Nous avons retrouvé ce résultat dans deux conditions différentes : en cultivant la bactérie sur divers milieux et en induisant l'enzyme avec des structures variées.

Les milieux utilisés le plus couramment sont le milieu à l'extrait de levure EL et le milieu au glucose et à l'hydrolysate de caséine G-HC avec ou sans vitamines. Les cinétiques d'apparition de l'enzyme sont identiques. Sur milieu G-HC, contenant $1,11 \cdot 10^8$ bactéries par ml au départ (figure 31) l'enzyme n'est décelable que 3 heures après l'addition de l'inducteur. Nous avons retrouvé également ce temps de latence sur milieu au lactate de sodium L, à l'acide succinique S, à l'acétate de sodium. Nous n'avons cependant pas effectué l'étude précise de la cinétique d'apparition de l'enzyme sur ces derniers milieux en raison de la longueur de la phase de latence dans la croissance et de l'intervention possible d'un système perméasique pour ces substrats, comme cela a été montré chez d'autres *Pseudomonas*.

Nous venons de voir dans le chapitre IV que de nombreuses structures

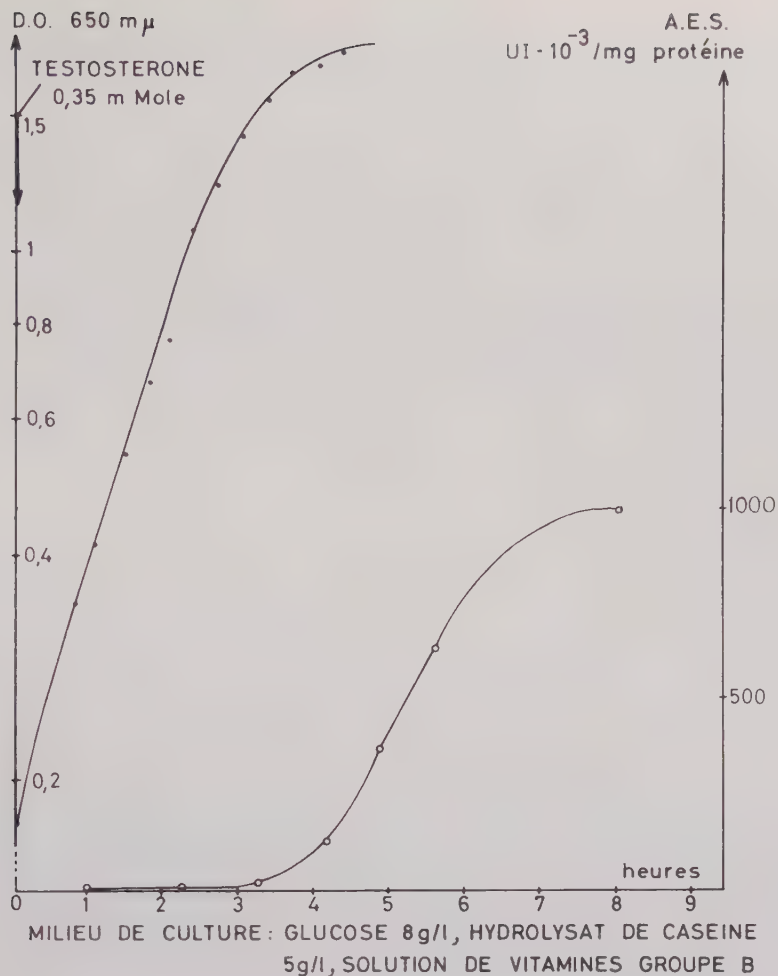


FIGURE 31

induisent l'enzyme 3~~x~~. Mais le temps de contact avec le stéroïde n'est pas indifférent : la quantité d'enzyme après 3 heures est pratiquement nulle, alors qu'après 6 heures, elle est facilement décelable.

Deux hypothèses, sur l'origine de ce temps de latence, peuvent donc être avancées d'après les résultats obtenus précédemment : 1°- Rôle de la nature particulière de l'inducteur, 2°- Rôle de constituants communs à certains milieux de culture. Il faut en ajouter trois autres : une concernant l'intervention de la méthode de dosage de l'enzyme, une autre la pénétration de la testostérone à l'intérieur de la bactérie, la troisième posant le problème du rôle inducteur propre de la testostérone (MICHEL-BRIAND, ROUX, CRASTES DE PAULET, 1966b). Au total sur ces cinq hypothèses, quatre seront examinées dans ce chapitre. La dernière (constituants du milieu de culture) sera considérée dans le chapitre VI.

II.- INFLUENCE DE LA COMPOSITION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES ET DE LA METHODE DE DOSAGE DE L'ENZYME.

On peut supposer que l'enzyme est présent dès les premiers instants de la culture mais n'est pas décelé. Trois causes peuvent alors être retenues :

- consommation de l'enzyme au cours d'une réaction ayant lieu dans les extraits de culture jeune,
- inhibition de l'activité enzymatique par une substance contenue dans ces extraits,
- sensibilité insuffisante de la méthode.

A)- Consommation de l'enzyme.

Le substrat métabolisé au cours de la réaction ne peut être qu'un stérol porteur d'un groupement hydroxyle en 3 ω . MARCUS et TALALAY (1956), HURLOCK et TALALAY (1957) ont en effet précisé très clairement la spécificité de cet enzyme. Or, l'inducteur que nous ajoutons (17 β -hydroxy, 3-oxo, androsta, 4-ène : testostérone) n'est pas porteur de cette fonction et malgré sa persistance dans la bactérie (cf. ce chapitre), il ne peut en aucune manière diminuer le taux d'enzyme que l'on dose. De plus les essais suivants permettent également d'écarter toute possibilité de consommation de l'enzyme par un substrat quelconque.

B)- Inhibition de l'activité enzymatique.

Pour démontrer la validité de cette hypothèse, on mélange à un extrait riche en activité enzymatique (AES = $600 \cdot 10^{-3}$ UI par mg de protéine) a) un extrait ne contenant pas d'enzyme, obtenu à partir d'une culture sur milieu G-HC en contact depuis 35 minutes avec la testostérone. Nous ne constatons alors aucune diminution dans la mesure de l'activité enzymatique par rapport à un témoin où l'extrait de culture jeune est remplacé par du tampon de SÖRENSEN, pH 7,2. b) un extrait dont l'activité enzymatique est légèrement décelable (AES = $17 \cdot 10^{-3}$ UI par mg de protéine), obtenu à partir d'une culture en contact depuis 3 heures avec l'inducteur. L'addition de quantité croissante de cette dernière solution (dont on recherche d'éventuelles propriétés inhibitrices) ne modifie nullement l'activité enzymatique de la solution à laquelle on l'incorpore. On constate même une additivité de ces valeurs. Il n'y a donc pas d'inhibition de l'activité enzymatique par les extraits réalisés à partir de culture jeune : ces extraits sont bien réellement dépourvus d'enzyme.

C)- Sensibilité insuffisante de la méthode.

Dans cette éventualité, on suppose que la méthode de dosage employée ne permet pas de détecter de faibles quantités d'enzyme.

Nous avons vu (chapitre II) que l'on peut mesurer dans une culture non induite 2.10^{-3} UI par mg de protéine. Or un extrait correspondant à une culture pleinement induite a en moyenne une activité de 300.10^{-3} UI par mg de protéine. Tout en conservant les conditions optimales de dosage, on voit donc que l'on peut détecter 150 fois plus d'enzyme dans le deuxième cas. La méthode employée peut donc être considérée comme suffisamment sensible.

D'autre part, nous avons toujours effectué l'extraction de l'enzyme sur des suspensions bactériennes de même densité optique de manière à obtenir des concentrations en protéines identiques. L'apparition de l'enzyme dans une culture à partir d'un certain temps, est donc bien significative.

Le premier groupe d'hypothèses, groupant les rôles éventuels de la composition des extraits enzymatiques et de la méthode de dosage de l'enzyme, ne peut pas être retenu comme étant à l'origine du temps de latence d'apparition de l'enzyme.

III.- INFLUENCE DE LA NATURE DE L'INDUCTEUR.

Selon cette hypothèse le temps de latence d'apparition de l'enzyme serait dû au fait que l'inducteur est un stéroïde. En effet on a retrouvé avec de nombreuses structures de ce type, ce même phénomène. Ce fait pourrait être dû à la faible concentration en stérol que l'on obtient dans le milieu de culture.

La production d'un enzyme inductible est fonction de la concentration de l'inducteur dans le milieu extérieur. MONOD et COHEN-BAZIRE ont montré en 1951 que la synthèse de la β -galactosidase augmentait avec la concentration de mélibiose et demeurait constante pour des molarités supérieures à 20.10^{-5} M.

On peut donc penser que la synthèse du 3 α -enzyme est retardée par suite de la solubilité du stérol qui, de faible au moment où on l'ajoute, s'accroît au fur et à mesure que la culture se développe.

Nous allons donc étudier successivement l'évolution de la concentra-

tion en testostérone dans le milieu de culture en présence d'un excès de ce produit, puis l'influence de différentes concentrations de ce stérol sur la synthèse d'enzyme; nous rapporterons ensuite des essais réalisés avec des structures particulièrement solubles; enfin nous donnerons les résultats obtenus avec le tween 80 ou des milieux riches en protéines.

A)- Lorsqu'on ajoute un excès de testostérone (500 mg par litre) à une culture en phase exponentielle sur milieu G-HC, on constate d'emblée la solubilisation de 85 mg de testostérone par litre, cette quantité s'élevant progressivement aux alentours de 100 mg par litre au cours des deux premières heures. L'augmentation de la solubilité dans les premières étapes de la culture est vraisemblablement due aux liaisons que contracte le stérol avec les constituants du liquide nutritif, réaction favorisée de plus par la légère alcalinisation accompagnant la croissance (BISCHOFF, 1954). Mais les 4/5 du composé restent inutilisés.

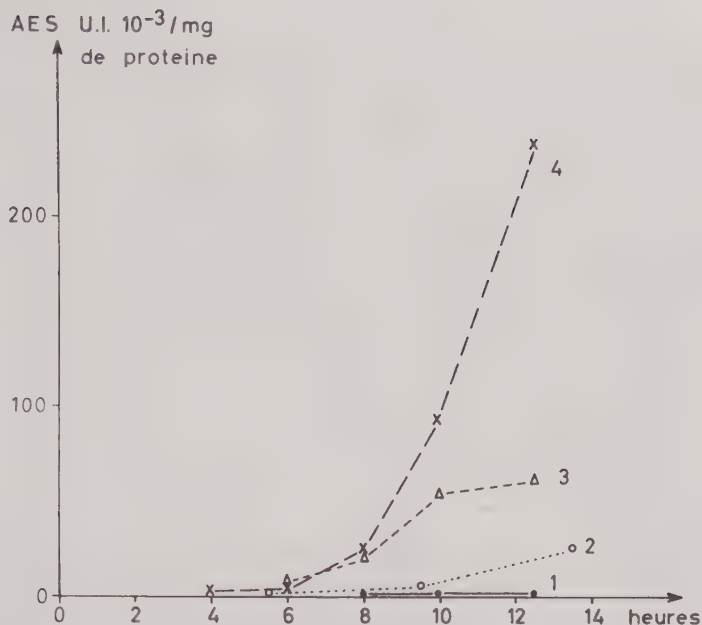
Pour le milieu de culture employé, il suffit donc d'incorporer 100 mg (0,35 mMole) de testostérone par litre. Nous avons contrôlé qu'après addition d'emblée de cette quantité, la concentration évoluait toujours sensiblement de la même manière et que le maintien de cette valeur ne provenait pas de la solubilisation progressive de stérol auparavant particulière, remplaçant le stérol soluble qui aurait pénétré dans la bactérie. Nous verrons d'ailleurs qu'il y a relativement peu de stéroïde intra-cellulaire.

B)- Lorsqu'on étudie la synthèse du 3 α -enzyme en fonction de la concentration en testostérone (figure 32), on constate que lorsque la concentration en stérol augmente :

- la production d'enzyme croît : ainsi à la 12ème heure, dans les conditions expérimentales un peu particulières précisées dans la légende, la quantité d'enzyme est quatre fois supérieure alors que la concentration en stérol ne double pas tout à fait (54 à 93 mg par litre). Des résultats analogues ont été obtenus par WACKER (1955).
- le temps de latence diminue, mais reste sensiblement le même pour les deux concentrations citées. Il est considérablement plus long pour de faibles molarités.

Si l'on ajoute des quantités de testostérone supérieures à 0,35 mMole (figure 33), on constate que le temps de latence d'apparition de l'enzyme reste toujours aussi important : l'excès de testostérone soluble n'intervient pas.

C)- Synthèse d'enzyme en présence de testostérone et de tween 80 (0,1%).



Influence de la concentration en testostérone sur la production de 3 α -enzyme. Milieu EL. Inoculum faible.

Nombre de bactéries au temps 0: $0,6 \cdot 10^8$ b/ml.

Courbe 1: sans testostérone

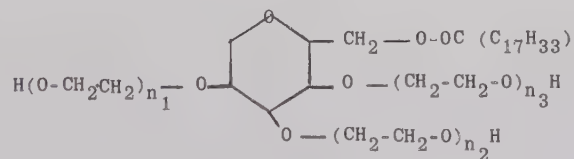
" 2: 10 mg testostérone par litre

" 3: 54 mg " " "

" 4: 93 mg " " "

FIGURE 32

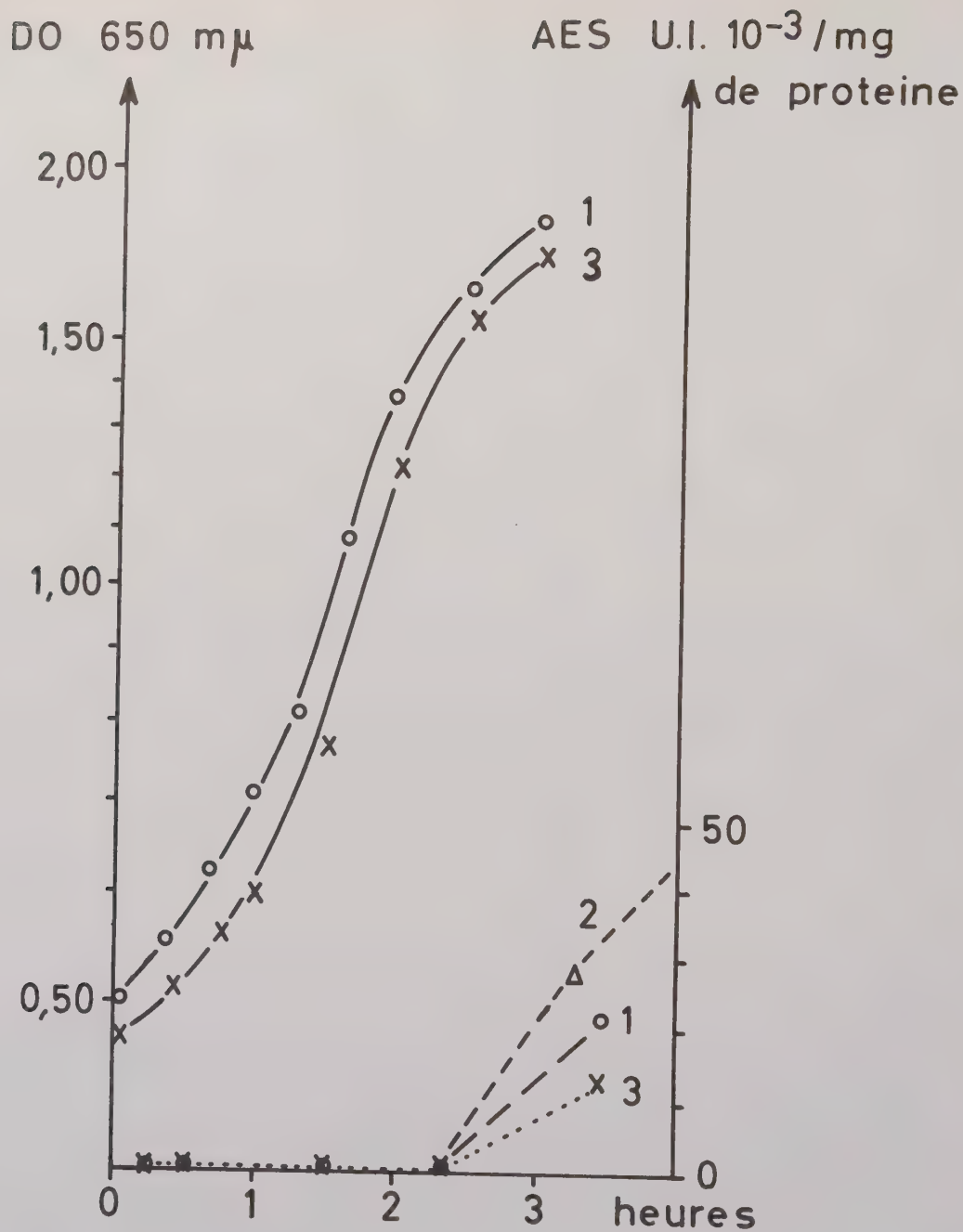
Le tween 80 est constitué par un mélange d'esters mono-oléiques de sorbitane poly-hydroxylé dont la formule générale est la suivante :



$$\text{où } n_1 + n_2 + n_3 = 20$$

Ce composé est employé comme agent de solubilisation de la testostérone et également pour faciliter la pénétration de ce stérol à l'intérieur de la bactérie.

a.- L'influence de l'addition de tween sur la croissance et la production d'enzyme est portée dans la figure 34. Il n'y a pas d'effet sur la crois-



Cinétique d'apparition de l'enzyme (traits pointillés) sur milieu HC, en présence de différentes quantités de testostérone.

- 1 : 100 mg
- 2 : 500 mg
- 3 : 1000 mg

Figure 33

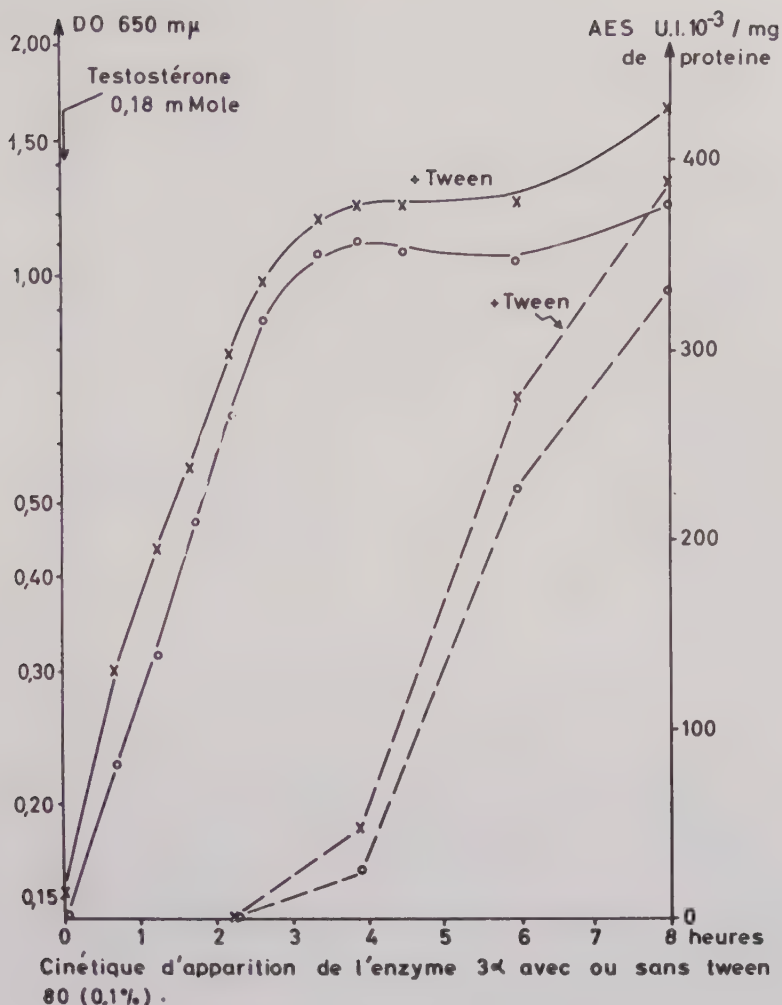


FIGURE 34

sance. La légère augmentation de la production d'enzyme, à un instant donné, ne peut pas être tenue pour significative. Enfin, l'enzyme apparaît toujours avec le même retard.

b.- L'influence du tween sur la pénétration de la testostérone $4C^{14}$ est mise en évidence sur la figure 35. On note que la fixation initiale par la bactérie est plus forte en présence de sorbitane mono-oléate, mais l'évolution de la quantité intra-cellulaire n'est pas modifiée par rapport à une culture sans tween. Les détails expérimentaux ainsi que ces derniers résultats seront discutés dans le paragraphe IV, A.

D)- Synthèse d'enzyme en présence de testostérone et de milieux riches en protéines.

On a vu que les protéines favorisent la solubilisation des stérols;

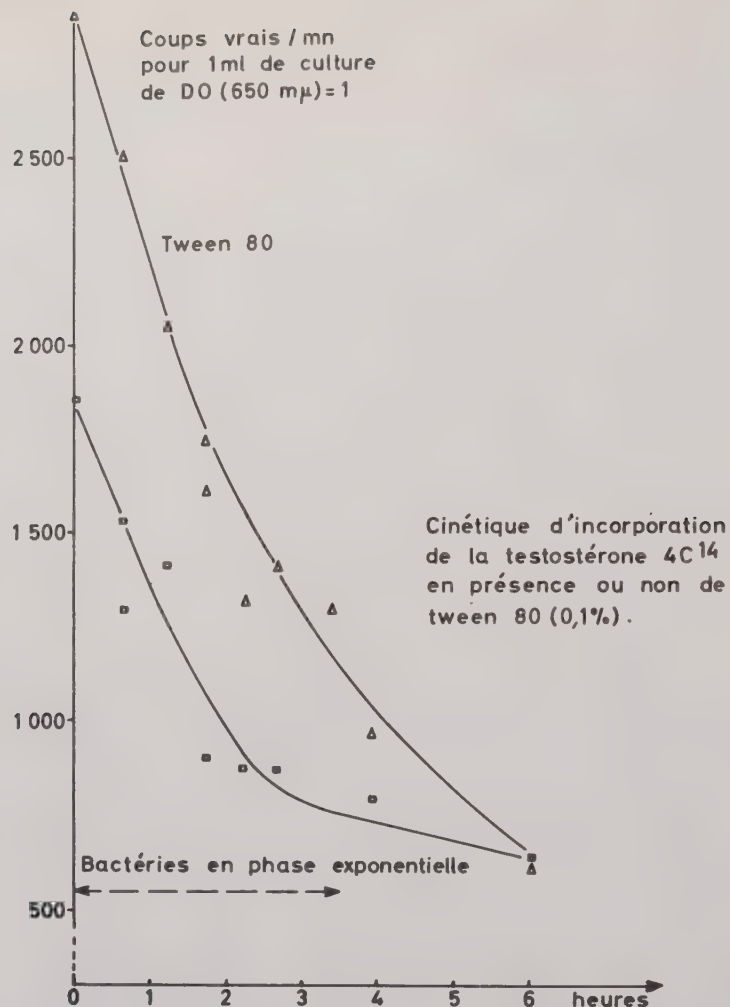


FIGURE 35

leur influence sur la production d'enzyme a été testée en utilisant soit de la sérum-albumine ajoutée à la concentration de 6% au milieu G-HC, soit une quantité importante d'autolysat de levure (10%). Dans les deux cas, l'enzyme apparaît toujours avec le même retard puisque 2h30 après l'addition de testostérone, aucune activité n'est décelable.

E)- Rôle d'un stérol soluble : le phosphate de déhydro-épiandrostérone (17β-hydroxy, 3-oxo, androsta 5(6)-ène : DHEA). Ce stérol, obtenu par action de l'oxychlorure de phosphore sur le DHEA, suivie d'hydrolyse, est soluble instantanément dans un milieu aqueux. La comparaison de la cinétique de production de l'enzyme en utilisant ce stérol-phosphate (PO₄-DHEA) (figure 36) et le stérol correspondant DHEA à une même concentration (0,35 mMole) (figure 29) ne montre aucune différence aussi bien dans le temps de latence que dans l'évolution du taux d'enzyme. Les résultats pré-

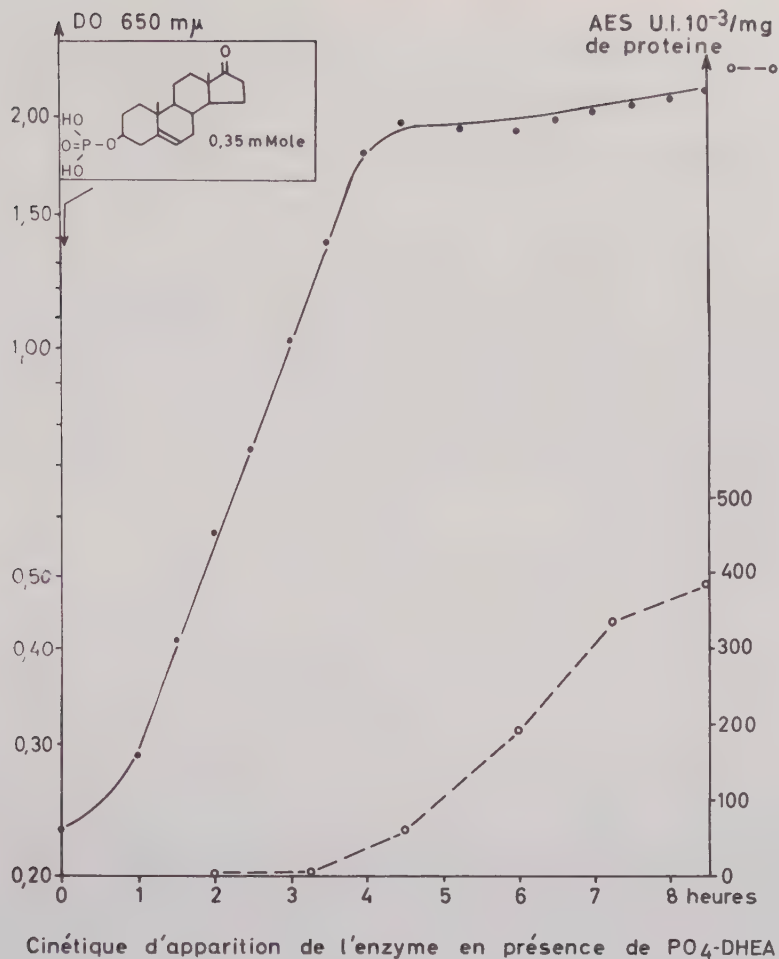
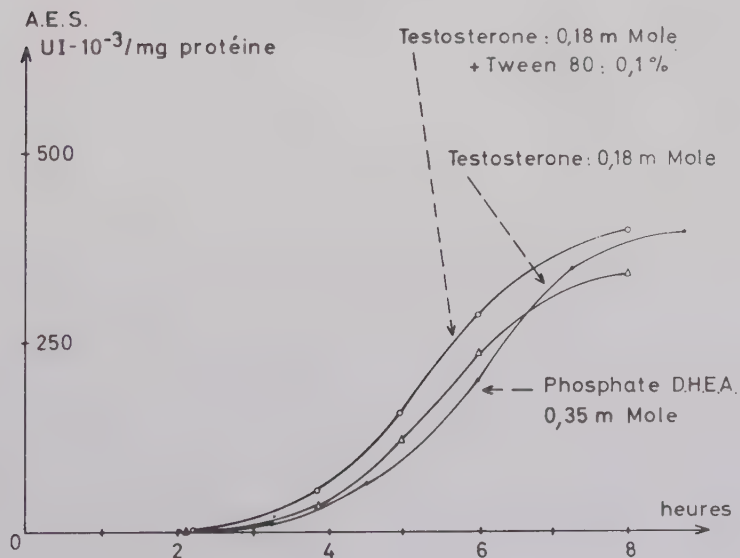


Figure 36



CINETIQUE D'APPARITION DU 3α -ENZYME
MILIEU : GLUCOSE - HYDROLYSAT DE CASEINE

Figure 37

cédents sont résumés dans la figure 37. On peut donc conclure que le retard d'apparition de l'enzyme n'est pas dû à une solubilité insuffisante du stérol dans les premiers instants de la culture.

IV.- ROLE DE LA PENETRATION DE LA TESTOSTERONE.

La testostérone, on l'a vu, est un substrat pour la bactérie en même temps qu'un inducteur d'enzymes. Pour satisfaire à ce double effet, les rapports de la testostérone avec la bactérie peuvent être les suivants :

- une simple adsorption,
- une pénétration passive par diffusion ou par un mécanisme de transport passif,
- une pénétration active par un système perméasique.

L'adsorption sur la face externe de la membrane cellulaire exigerait (pour que le double effet signalé plus haut soit possible) que le mécanisme initiateur de l'induction, ainsi que les enzymes nouvellement formés, soient situés sur la face *externe* de la membrane. Cette hypothèse paraît improbable. En effet : 1°- si certains enzymes dégradant la testostérone apparaissent bien liés à des structures sédimentables à 105.000 g pendant 30 minutes (Δ_1 -déshydrogénase, LEVY et TALALAY, 1959b), le 3 (17) β -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase est soluble (résultats non publiés); 2°- on comprend difficilement qu'un système initiateur de l'induction aussi accessible au stérol soit responsable d'un temps de latence aussi important dans l'apparition du 3 α -enzyme.

La testostérone doit donc pénétrer dans la bactérie et les essais rapportés ont pour but de mettre en évidence si le mécanisme de pénétration peut être à l'origine du retard d'apparition du 3 α -enzyme.

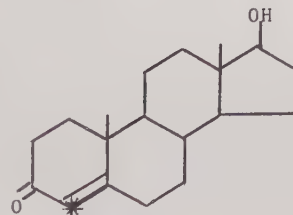
1°- PENETRATION PASSIVE DE LA TESTOSTERONE.

La concentration intra-bactérienne doit être à un taux suffisant pour "impressionner" le mécanisme initiateur de l'induction. Dans le cas d'une pénétration de type passif, on peut concevoir que l'incorporation du stérol est lente et que son accumulation progressive est nécessaire. Cette dernière serait d'ailleurs possible puisque les enzymes dégradant la testostérone, donc diminuant son taux, ne sont pas encore présentes du fait même qu'elles sont en majeure partie de nature induite.

Deux types d'essais ont été réalisés :

A.- Etude de l'incorporation de testostérone radioactive $4C^{14}$ par une culture en phase exponentielle.

a)- Conditions expérimentales : on dispose d'un milieu G-HC contenant 0,35 mMole de testostérone dont une partie est marquée au carbone $4C^{14}$ de manière à obtenir une activité radioactive de $1,36.10^{-6}$ mc par ml de milieu. On s'assure que la testostérone est entièrement solubilisée par filtration sur papier Whatman n°1 et détermination de l'activité radioactive sur filtrat. On ensemence ce milieu par un inoculum en phase exponentielle. A différents temps de la croissance on prélève des volumes décroissants de manière à recueillir sur filtre Millipore (pore de 0,45 μ) un nombre sensiblement constant de bactéries. On lave ces dernières sur le filtre, par 5 ml de milieu G-HC stérile et à +2°. L'activité radioactive est mesurée à l'appareil TRICARB.



b)- Les résultats sont portés sur la figure 38. On remarque que la quantité de testostérone rapportée à un nombre donné de cellules diminue pendant les 2h30 suivant l'inoculation, pour ensuite rester sensiblement constante jusqu'à la 6ème heure. La quantité de testostérone incorporée par ml de culture reste relativement faible puisqu'on observe qu'au temps 0, 8,5% de la testostérone libre est incorporée dans les cellules (culture de densité optique 0,14) pour s'élever à 23% 2h30 après (culture de densité optique 0,90). Enfin l'enzyme n'apparaît toujours que 3 heures après addition de l'inducteur et cette apparition ne succède pas à l'accumulation de testostérone.

c)- Interprétation. La vitesse de pénétration du stérol ne paraît pas en cause dans le phénomène de l'induction enzymatique tel que nous l'observons, puisque la radioactivité est d'emblée maximum. Les résultats précédents demandent cependant à être discutés. 1°- La diminution en fonction du temps de la quantité de testostérone radioactive retrouvée dans une cellule est bien réelle. En effet le nombre de bactéries est le même dans chaque prélèvement et s'il y a un effet de quenching, il reste constant pour chaque comptage. 2°- Cette baisse d'activité radioactive peut résulter de deux mécanismes antagonistes agissant d'une part sur la pénétration du stérol, d'autre part sur sa fuite hors de la cellule sous forme de testostérone ou de ses produits de dégradation. Ce dernier cas supposerait un métabolisme rapide et l'élimina-

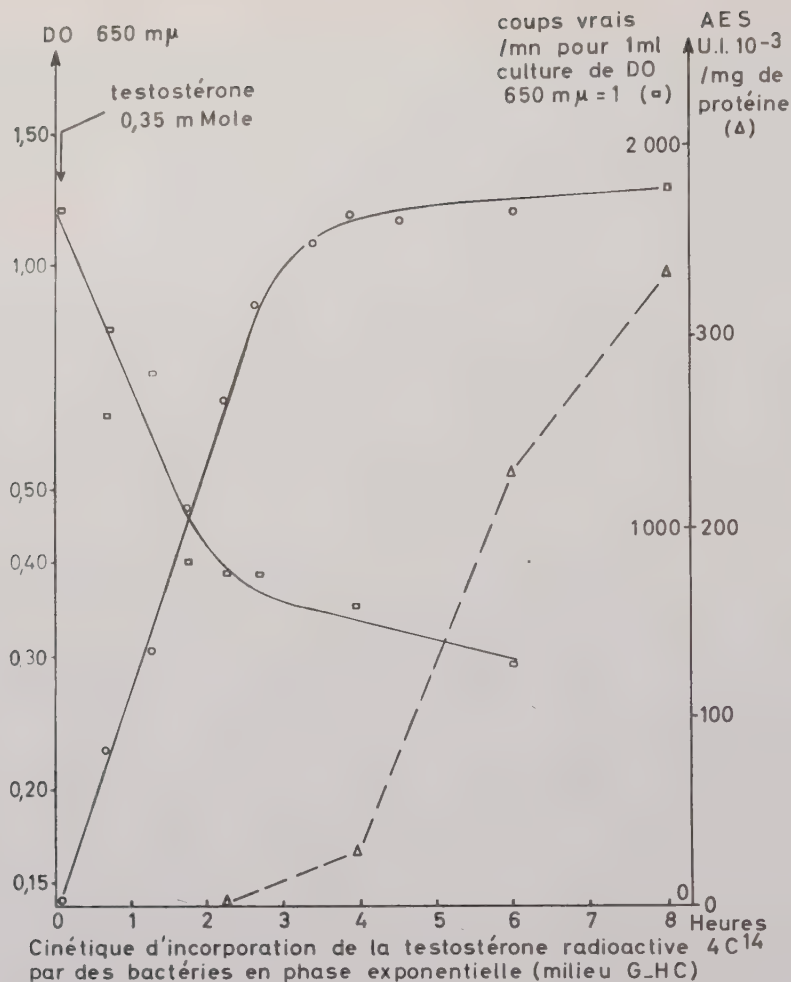


FIGURE 38

tion du carbone $4C^{14}$ sous forme de gaz carbonique. Ces faits ont été déjà rapportés par LEVY et TALALAY (1959a). Ces auteurs indiquent que "la production de $C^{14}O_2$ à partir de la testostérone $4C^{14}$ incubée avec *Ps. testosteroni* intervient "précocement" dans l'oxydation de ce stéroïde, indiquant que le noyau A est attaqué rapidement". Nous n'avons pas effectué de mesure de radioactivité sur les filtrats et il est impossible dans ces conditions d'interpréter clairement ces résultats. Cependant il paraît difficile de concevoir un tel mécanisme, puisque l'on sait que les enzymes dégradant la testostérone sont induits avec le même retard que le 3α -enzyme et qu'il est douteux que la faible quantité d'enzyme constitutif puisse diminuer aussi nettement le taux de carbone C^{14} . Quelles que soient les difficultés d'interprétation, il faut noter qu'il reste suffisamment de testostérone intracellulaire après 2h30, pour que l'enzyme apparaisse. Mais il reste à démontrer

que cette radioactivité que l'on mesure est bien liée à la testostérone. L'expérience suivante permet de le confirmer :

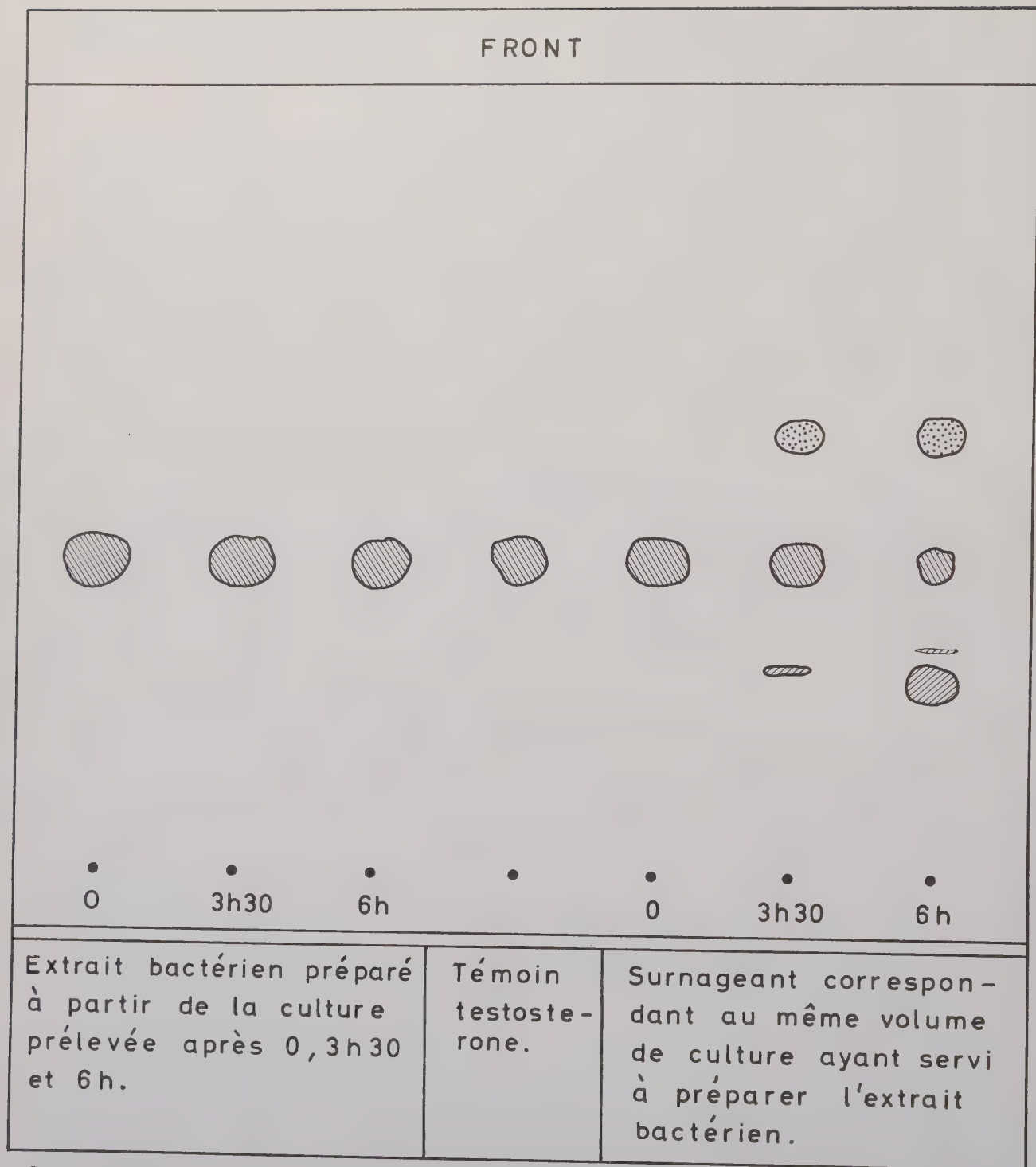
B.- Dosage de la testostérone intracellulaire.

- a)- Conditions expérimentales : on dispose d'une culture sur milieu G-HC en phase exponentielle, à laquelle on ajoute 0,35 mMole de testostérone dont on contrôle la parfaite solubilité. L'extraction de l'inducteur non lié aux protéines est faite suivant la technique proposée par G.N. COHEN (1956). Des fractions de cette culture sont prélevées, centrifugées à 10.500 g pendant 10 minutes à 0°. Le surnageant éliminé, on sèche parfaitement les parois du tube. L'extraction du stérol intracellulaire se fait par chauffage de la suspension de bactéries en eau distillée, au bain marie à 100° pendant 5 minutes. La solution est séparée des corps bactériens par centrifugation à +20° pour éviter la précipitation du stérol. Le dosage de la testostérone est effectué par mesure de l'absorption de cette solution aqueuse à 254,5 mμ. On a vérifié que l'on dose uniquement ce composé. En effet si l'on ajoute une solution de testostérone à cet extrait, on note que le maximum d'absorption est toujours à la même longueur d'onde et que son intensité est égale à la somme des intensités de l'extrait et de la solution.
- b)- Les résultats sont portés sur les figures 39 et 40 : la figure 39 montre que l'on retrouve essentiellement de la testostérone à l'intérieur des cellules (chromatographie de l'extrait bactérien) alors que ses dérivés sont identifiables dans le surnageant du milieu de culture. Ce fait confirme bien que le dosage spectrophotométrique concerne uniquement la testostérone. Quant à la figure 40, elle met en évidence une diminution de la testostérone intracellulaire en fonction du temps. L'apparition de l'enzyme n'est donc pas secondaire à l'accumulation de ce stérol à l'état libre, dans la bactérie.

2°- PENETRATION ACTIVE DE LA TESTOSTERONE PAR UN SYSTEME DE PERMEATION.

Les expériences précédentes semblent exclure un système de pénétration tant passif qu'actif. Mais il est intéressant d'étudier avec plus de précision si les cellules une fois induites possèdent un pouvoir de pénétration plus rapide que les cellules non induites (COHEN, 1957), et c'est dans le but de rechercher un système perméasique induit que les essais suivants ont été entrepris :

- a)- Préparation de bactéries non induites et induites. Deux cultures sont effectuées sur milieu G-HC. Sur l'une d'elles on prélève un premier



Chromatographie sur gel de Silice — Solvant: Benzène 3 parties, éther 7 parties.

FIGURE 39

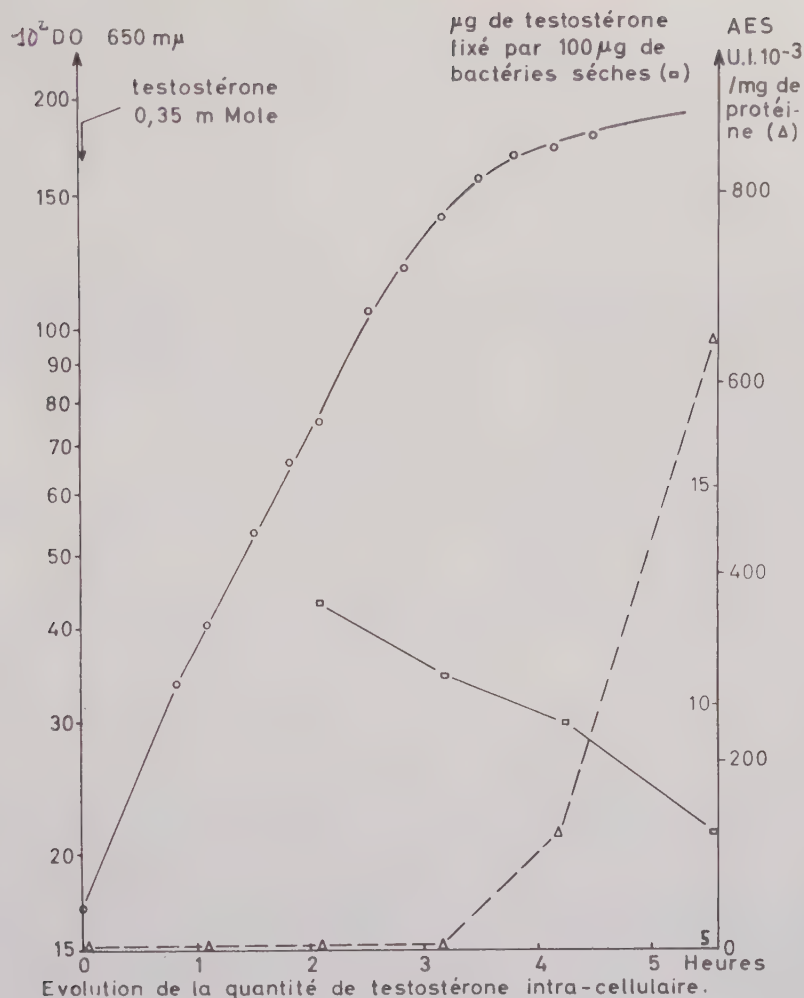


FIGURE 40

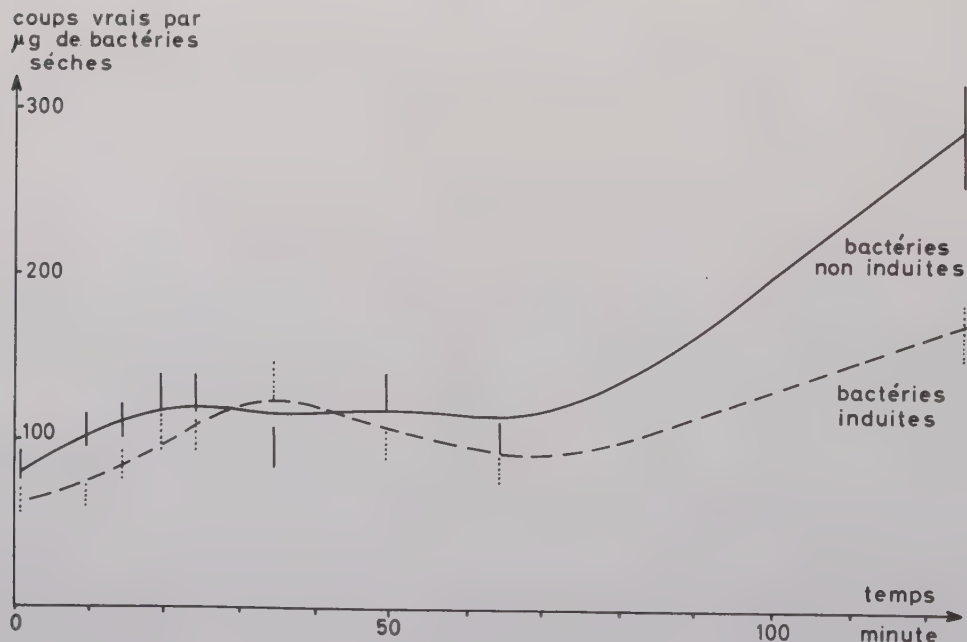
lot de bactéries (AES : $110 \cdot 10^{-3}$ UI par mg de protéine) en fin de phase exponentielle et un deuxième lot en phase stationnaire. On répète les mêmes manipulations sur la seconde culture à laquelle $0,70$ mMole de testostérone est incorporé au temps zéro.

- b)- Mise en contact avec la testostérone $4C^{14}$. Les bactéries lavées par du tampon de SÖRENSEN pH 7,2 dont la température est de $+2^\circ$, sont mises en suspension, à raison de $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ dans le milieu G-HC (pour maintenir les bactéries dans la solution nutritive qui assure normalement leur croissance), en présence de chloramphénicol ($50 \mu\text{g}$ par ml) et de testostérone $4C^{14}$ ($20,3 \mu\text{g}$ par ml, avec une activité radioactive de $1,118 \cdot 10^{-5}$ mc par ml). On effectue les mêmes expériences en présence d'un inhibiteur de la phosphorylation oxydative, le nitrure de sodium à la concentration de $2 \cdot 10^{-2}$ M.

c)- L'étude de l'incorporation de la testostérone est réalisée sur 1 ml de suspension prélevé aux temps (minutes) 1, 9, 14, 19, 24, 34, 49, 64, 124. Les prises d'essais sont filtrées sur membrane Millipore (pore de $0,45 \mu$) et les bactéries sont ensuite lavées par 2 ml de milieu G-HC dont la température est de $+ 4^{\circ}$.

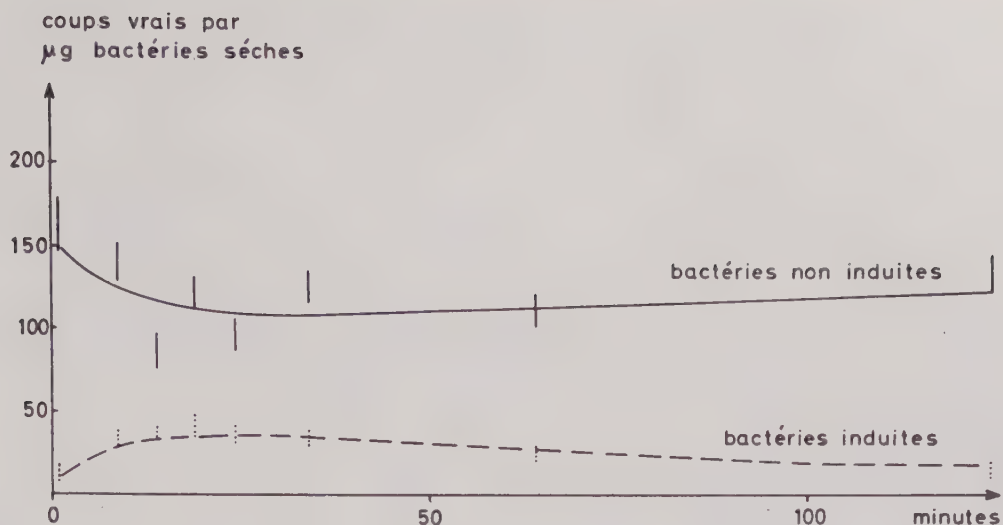
d)- Résultats et interprétations. Pour des bactéries prélevées en phase de croissance exponentielle (figure 41), on remarque d'abord qu'il n'y a pas de différence significative, dans l'incorporation de la testostérone, entre une culture induite et non induite et ensuite, que le pourcentage d'incorporation reste faible : il évolue entre 4,5% (temps 0) et 16% (temps 124 minutes). On peut calculer que chaque bactérie incorpore au temps 0 : $9.10^{-12} \mu\text{Mole}$. Ces faits prouvent qu'il n'y a pas de processus de perméation inductible à la condition que ce dernier soit insensible à la composition du milieu de culture.

Pour des bactéries prélevées en phase stationnaire (figure 42), la pénétration initiale (en moins d'une minute) est nettement moins importante pour des bactéries induites, comme si des sites intracellulaires avaient déjà été saturés au préalable, au cours de la culture.



Cinétique d'incorporation de la testostérone radioactive $4C^{14}$ par des bactéries prélevées en phase exponentielle et mises en suspension dans le milieu G-HC + chloramphénicol $50 \mu\text{g/ml}$.

FIGURE 41



Cinétique d'incorporation de la testostérone radioactive $4C^{14}$ pour des bactéries prélevées en phase stationnaire et mises en suspension dans le milieu G.HC + chloramphénicol $50 \mu g / ml$.

FIGURE 42

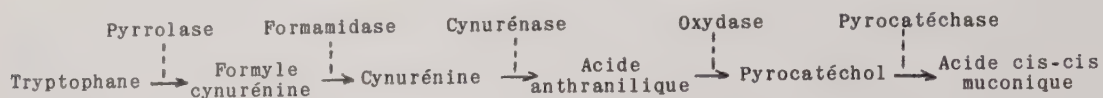
Enfin, les essais d'incorporation en présence de nitrure de sodium ne montrent pas de diminution de la pénétration de la testostérone, ce qui élimine un processus actif faisant intervenir une phosphorylation oxydative, bien que l'on ait signalé des exceptions à cette interprétation.

3°- EN CONCLUSION, la pénétration de la testostérone semble se faire d'emblée à son taux maximum, dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées. Elle ne peut pas être, par conséquent, à l'origine du temps de latence d'apparition de l'enzyme 3α .

V.- LA TESTOSTERONE EST-ELLE INDUCTRICE ?

Cette hypothèse peut paraître paradoxale puisque l'apparition de l'enzyme succède à l'addition de ce stérol. Un mécanisme analogue à celui cité par BURSTEIN (1964) ne peut pas être en cause. En effet, bien que les produits de transgalactosidation du lactose soient seuls inducteurs de la β -galactosidase chez *Escherichia coli* le temps de latence d'apparition de l'enzyme est de quelques minutes. Mais il a été montré par PALLERONI et STANIER (1964) que l'apparition tardive d'un enzyme succédant à l'addition d'un substrat considéré comme inducteur peut être due à la transformation de ce produit en métabolite qui lui, est le véritable inducteur : l'induction est dite "grossièrement" séquentielle. C'est ainsi que lorsque l'on

ajoute du L-tryptophane, la pyrocatéchase n'apparaît que 2 heures après dans les cellules de *Pseudomonas fluorescens*. Or la chaîne métabolique dérivant du tryptophane est la suivante :

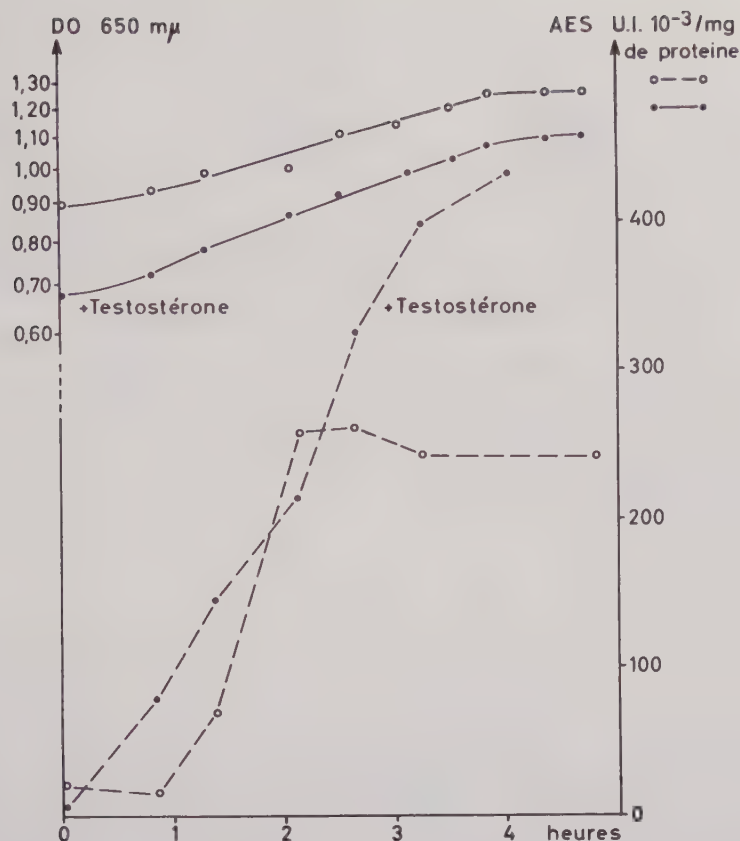


Le mécanisme de production de la pyrocatéchase est alors expliqué de cette manière : *Pseudomonas fluorescens* possède à l'état normal, une faible quantité de tryptophane intracellulaire libre. Lorsqu'il y a un excès de tryptophane à l'extérieur de la cellule, PALLERONI et STANIER ont montré que cet acide aminé est dégradé par les enzymes constitutifs : pyrrolase et formamidase, pour donner de la L-cynurénine. Bien que ces deux enzymes soient en faible quantité, le taux de L-cynurénine s'élève à une concentration telle qu'il induit la synthèse nouvelle et coordonnée de pyrrolase et formamidase. Secondairement, le même produit induit la cynurénase et la pyrocatéchase. Un phénomène analogue a été trouvé par HEGEMAN (1966) dans la voie catabolique dérivant de l'acide D-mandélique. Dans notre cas, la testostérone ne se comporterait que comme le fournisseur du métabolite réellement inducteur.

Le rôle du stérol pourrait être encore moins actif : ALBRECHT et WIX (1966) ont montré que des 3-céto, Δ -1,4 stéroïdes, inhibaient la synthèse induite de la Δ 1-déshydrogénase de *Corynebacterium simplex*. On peut donc supposer que non seulement la testostérone ne serait pas inductrice en elle-même, mais que sa présence empêcherait l'apparition de l'enzyme 3 α . Les essais suivants permettent de tester ces hypothèses :

1°- La testostérone est-elle inhibitrice ? Si l'on met des bactéries en présence d'un surnageant de culture induite (une culture induite est formée de bactéries en contact depuis 6 heures avec la testostérone et contenant donc de l'enzyme), on constate que le 3 α -enzyme apparaît précocement (figure 43). Si à une telle culture, on ajoute de la testostérone, nous devrions observer un retard de la production de la protéine enzymatique, au cas où ce dernier substrat serait inhibiteur. Or il n'en est rien. L'enzyme apparaît au contraire plus précocement, et à un taux plus élevé, ce résultat mettant en évidence le rôle non-inhibiteur et même inducteur propre de la testostérone, fait sur lequel nous reviendrons.

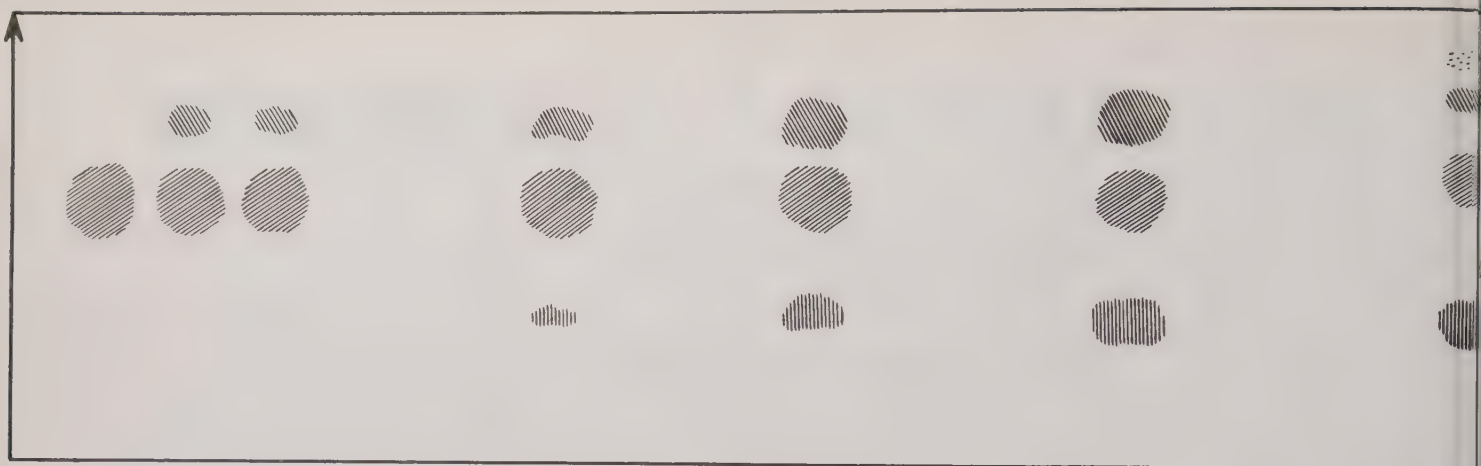
2°- La testostérone est-elle le véritable inducteur ? Cette hypothèse semblerait confirmée par l'observation suivante : au cours de la croissance de *Pseudomonas testosteroni*, si l'on suit l'apparition, d'une part,



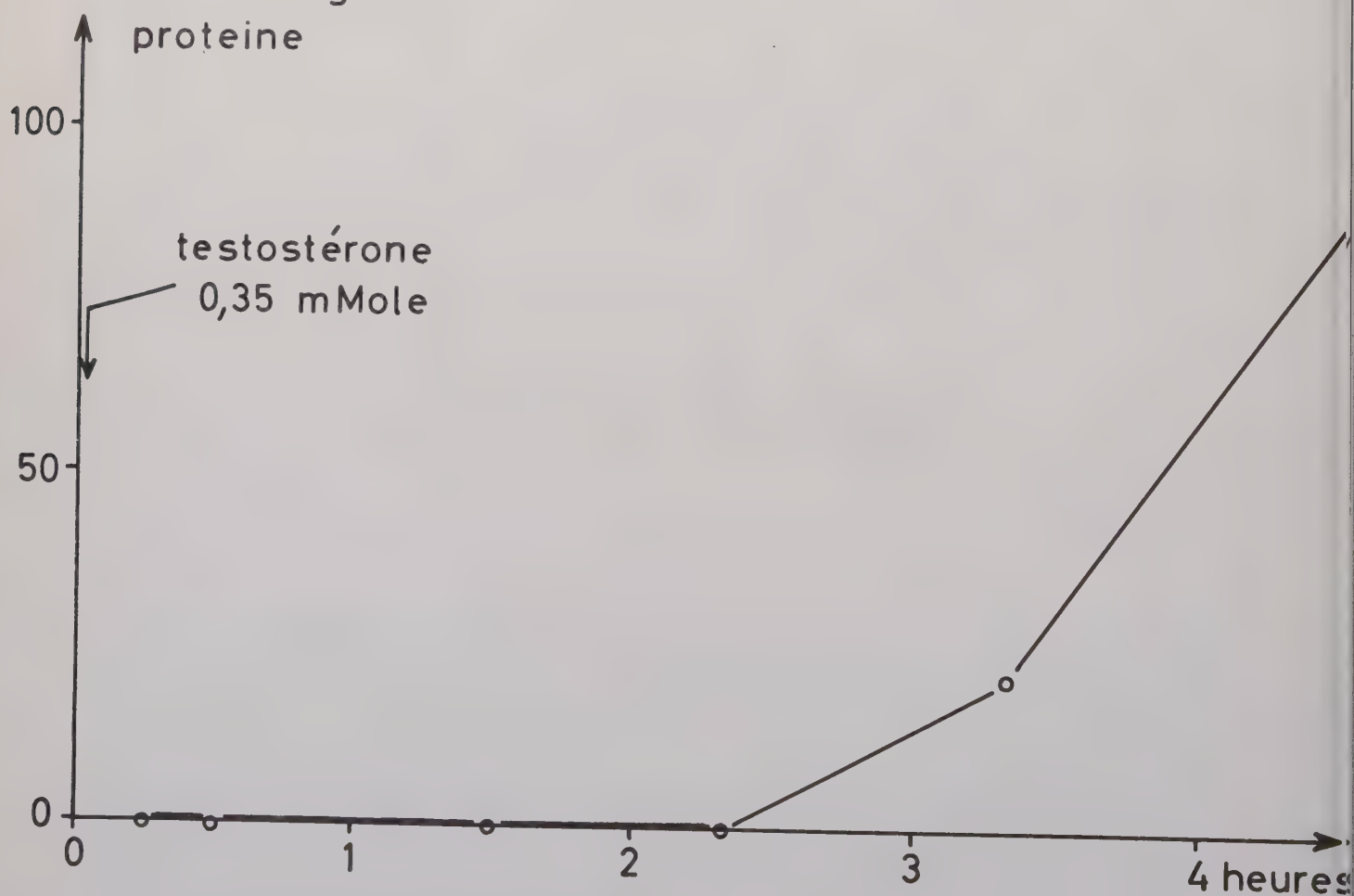
Cinétique d'apparition de l'enzyme dans une culture formée de "bactéries non induites" mises en contact avec :
 - Un surnageant de "culture induite" o—o
 - Un surnageant de "culture induite" + 0.017 mMole de testostérone •—•

FIGURE 43

des dérivés de la testostérone et, d'autre part, de l'enzyme 3α (figure 44), on note que de faibles quantités de 3,17-dioxo, androsta 4-ène, et de 17β -hydroxy, 3-oxo, androsta 1,4-diène sont décelables avant que l'enzyme soit présent, la proportion de ces produits continuant à augmenter une fois l'enzyme formé. On peut donc concevoir que de faibles quantités d'enzymes constitutifs (autre que le 3α -enzyme) permettent la formation de ces métabolites et que lorsque la concentration en ces derniers devient suffisante, le 3α -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase apparaît. Cette relation métabolites- 3α -enzyme est retrouvée dans l'expérience suivante (figure 45) : si on réalise une induction par de la testostérone, au sein d'une culture évoluant dans le même milieu depuis 5 heures (milieu dit "épuisé") (figure 45-2), les métabolites apparaissent précocement et l'enzyme également; au contraire si on ajoute à la même culture non seulement de la



AES U.I. 10^{-3} /mg de
protéine



Cinétique de production de l'enzyme et apparition des
métabolites de la testostérone (dépot de $100\mu\text{g}$ de produit
sec sur gel de silice). Milieu de culture : G - HC.

Figure 44

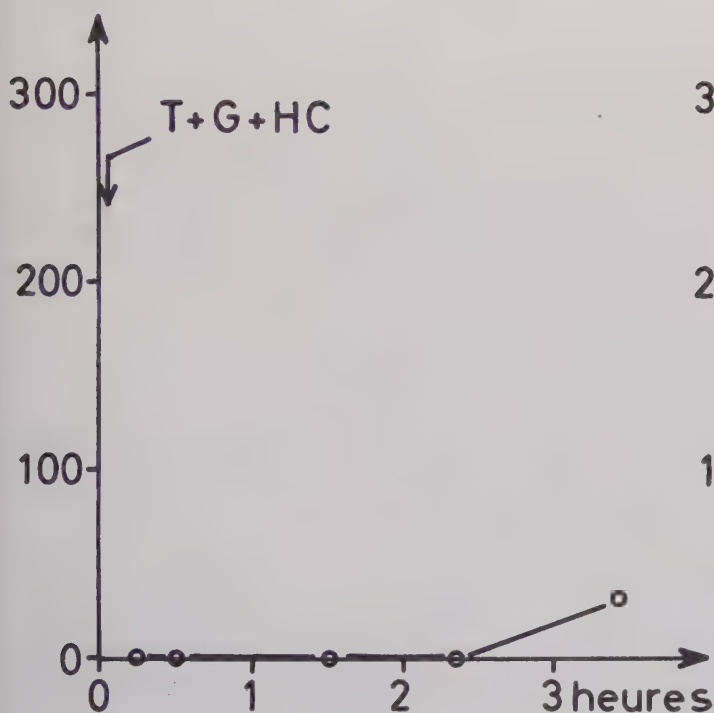
(1)



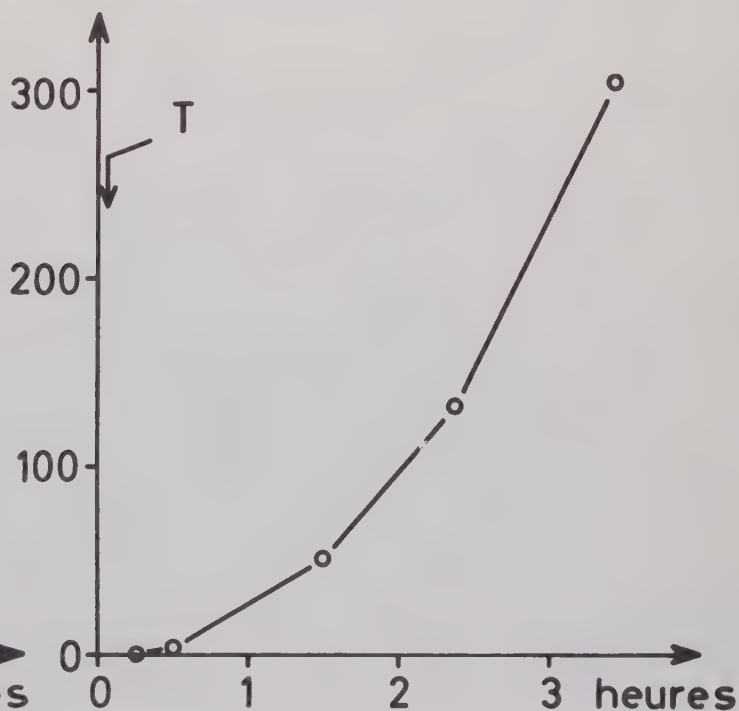
(2)



AES



AES



Cinétique d'apparition des métabolites de la testostérone T, et cinétique de production de l'enzyme 3 α sur milieu épuisé (2) et sur milieu épuisé auquel on ajoute G + HC (1).

Figure 45

testostérone mais aussi du glucose (8g/l), de l'hydrolysate de caséine (5g/l) (figure 45-1) l'enzyme et les métabolites apparaissent tardivement. L'interprétation de ces résultats met en évidence le rôle du glucose et de la caséine dans le retard d'apparition non seulement de l'enzyme (nous reviendrons sur ces faits) mais aussi des métabolites dont la formation ne semble pas due uniquement à des enzymes constitutifs. Cependant dans ces deux manipulations, la présence de l'enzyme et des dérivés de la testostérone est simultanée. L'expérience suivante, dissociant ces deux facteurs, doit permettre de préciser le rôle des métabolites :

On inocule un surnageant de culture induite (contenant des métabolites de la testostérone) par des bactéries non induites (figure 46) : l'enzyme est décelable 45 minutes après (2) (Nous n'avons pas effectué de prélèvement auparavant). On effectue la même manipulation en ajoutant en plus du glucose et de l'hydrolysate de caséine; l'enzyme apparaît seulement 2h30 après, malgré la présence des métabolites de la testostérone (figure 46-1).

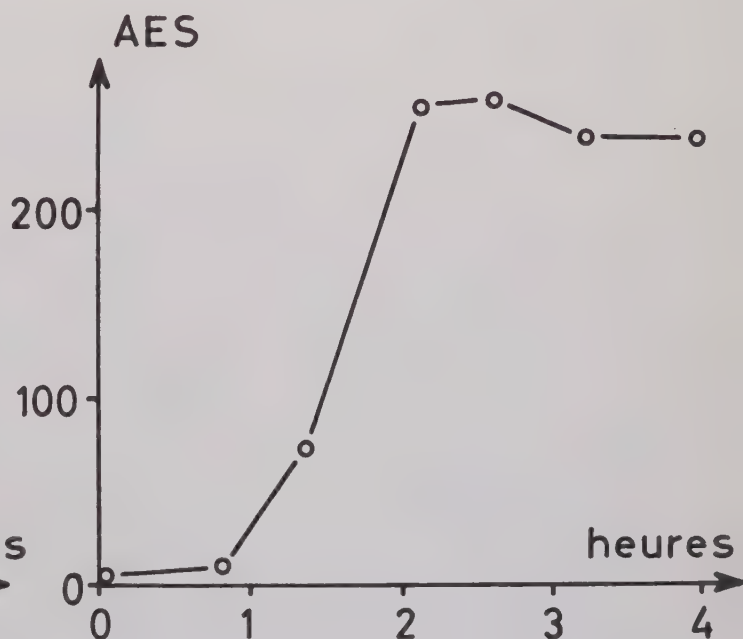
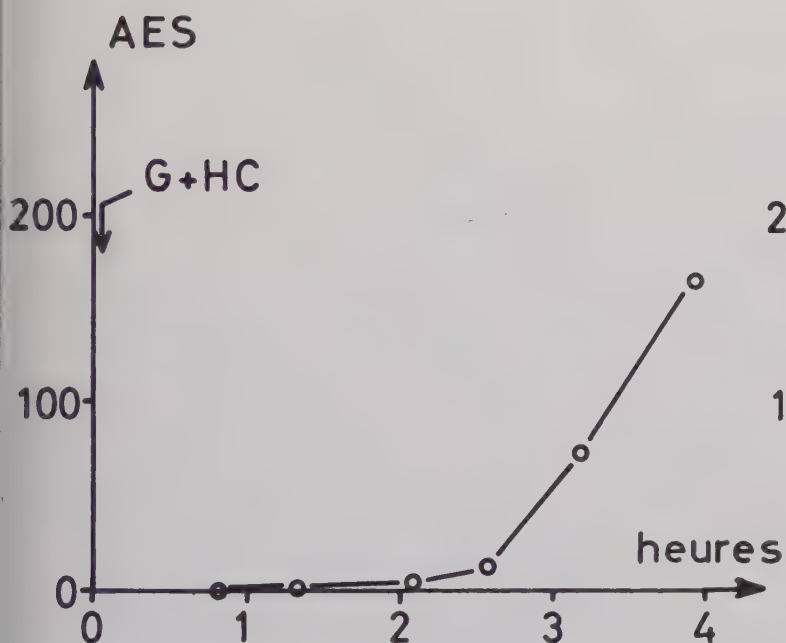
Il semble bien que le processus d'induction séquentielle, dans les conditions de culture que nous avons employées, n'a pas de rôle important. Ces faits ont été confirmés par les expériences d'induction effectuées dans les conditions habituelles et en présence des trois métabolites connus de la testostérone (figures 47 et 48). Le temps de latence d'apparition de l'enzyme est toujours le même.

La testostérone est donc bien inductrice par elle-même et ses métabolites le sont au même titre qu'elle, non seulement parce qu'ils déterminent le même temps de latence, mais aussi parce que dans un milieu ayant déjà servi à la croissance, ils donnent la même cinétique d'apparition du 3 α -enzyme. En effet, nous constatons d'après la figure 49, qu'il n'y a pas de différence entre un surnageant de culture contenant ces produits formés par la bactérie elle-même et un surnageant de culture auquel on ajoute de la testostérone.

(1)

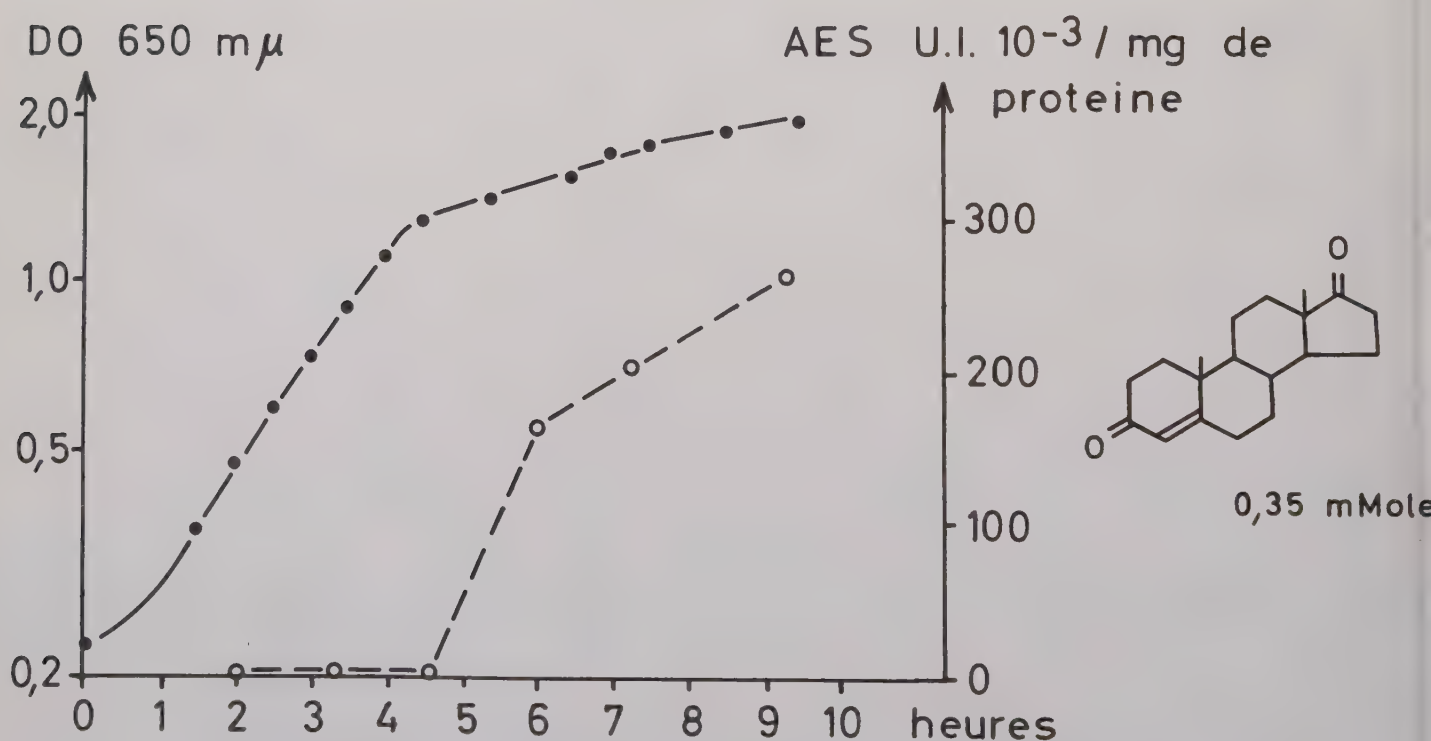
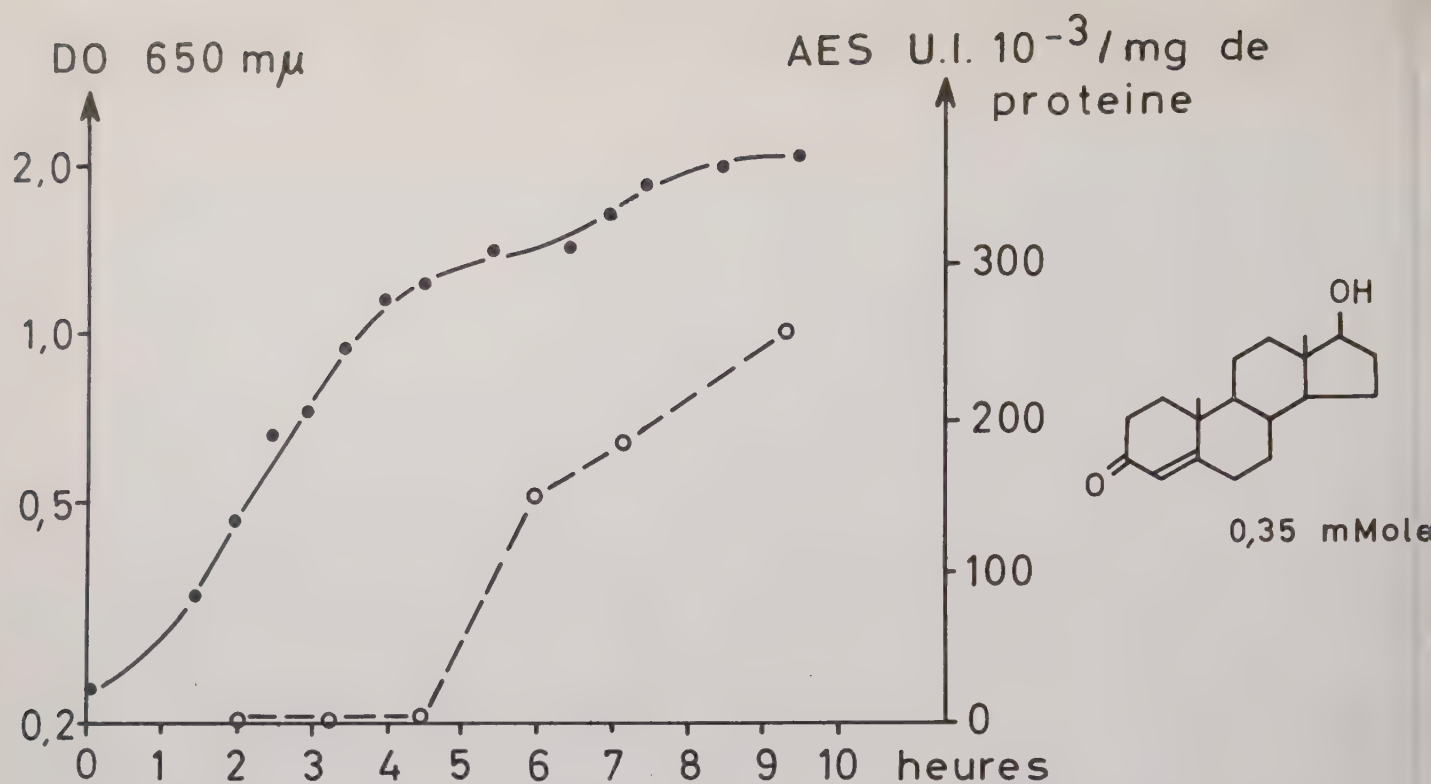


(2)



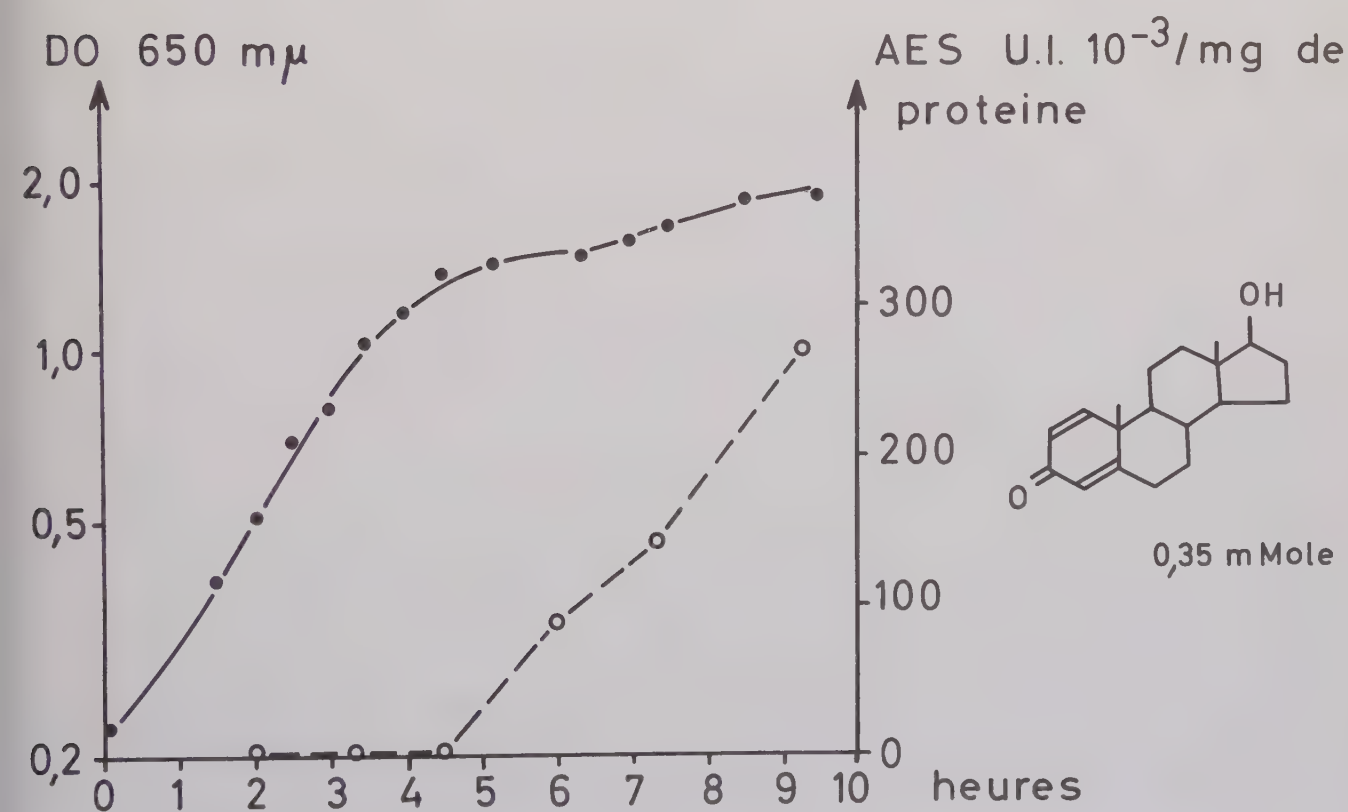
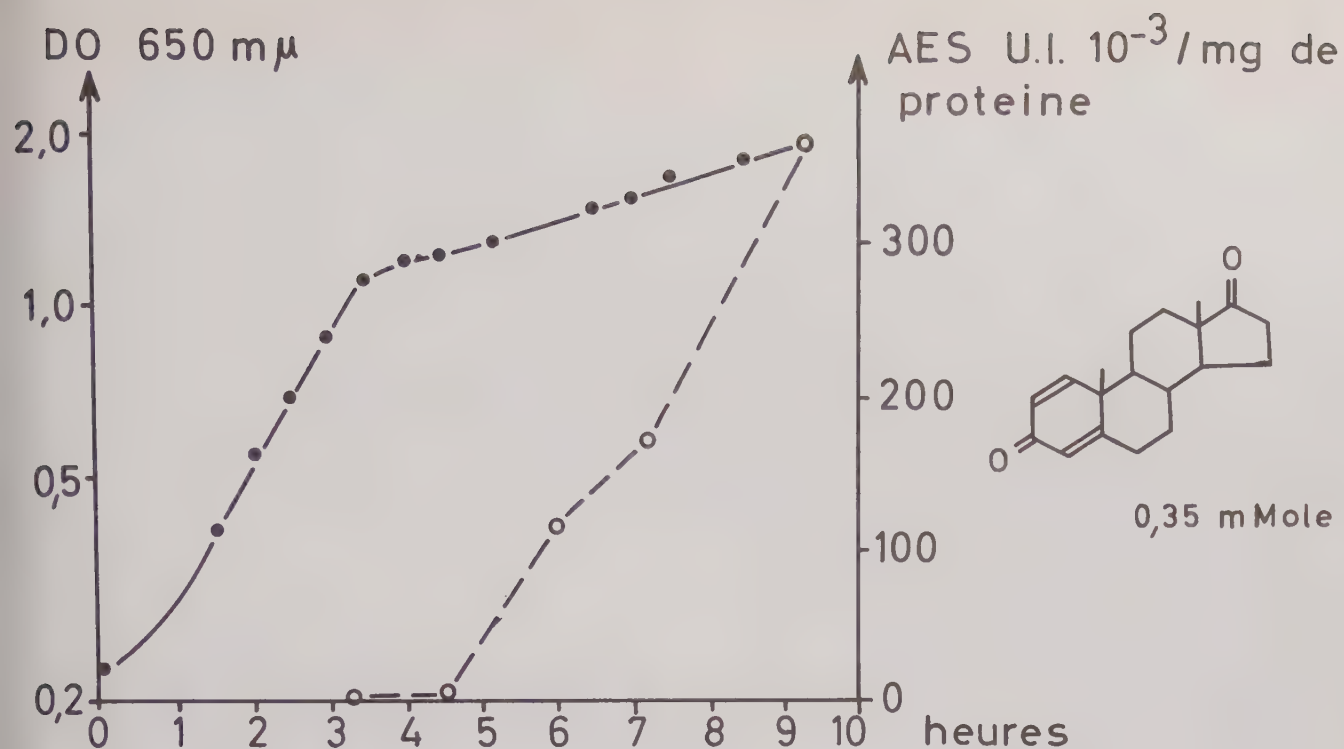
"Bactéries non induites" mises en contact avec un filtrat de "culture induite" contenant des métabolites de la testostérone (2) et avec le même filtrat auquel on ajoute du glucose et de l'hydrolysate de caseine (1)

Figure 46

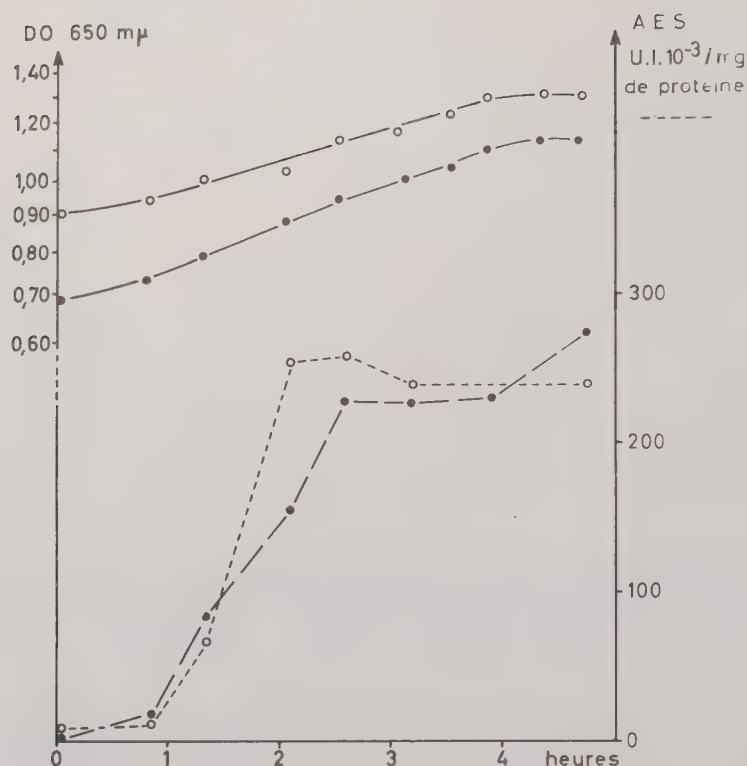


Cinétique d'apparition de l'enzyme en présence de testostérone et de 3,17 - dioxo,androsta,4-éne.

FIGURE 47



Cinétique d'apparition de l'enzyme en présence de 3,17-dioxo,androsta,1,4-diène et de 17 β -hydroxy,3-oxo,androsta,1,4-diène.



Cinétique d'apparition de l'enzyme dans une culture formée de "bactéries non induites" mises en contact avec :

- un surnageant de "culture induite" o---o
- un surnageant de "culture non induite" + 0.17 mMole de testostérone •—•

FIGURE 49

VI.- CONCLUSIONS.

Sur les cinq groupes d'hypothèses que nous avons données au début de ce chapitre, celles concernant la méthode de dosage, la nature particulière de l'inducteur, la pénétration de la testostérone ou enfin le rôle inducteur propre de la testostérone, peuvent être écartées.

L'influence des constituants du milieu de culture apparaît assez clairement dans les dernières expériences que nous rapportons. C'est cette dernière hypothèse qui va être discutée dans le chapitre suivant.

VII.- RESUME DU CHAPITRE V.

Lorsqu'on ajoute de la testostérone à une culture en phase exponentielle sur milieu au glucose et à l'hydrolysate de caséine, le 3 α -enzyme n'est décelé que 3 heures après. Quatre groupes d'hypothèses peuvent être donnés sur l'origine de ce temps de latence.

Dans un premier cas, on peut supposer que l'enzyme est présent, mais n'est pas décelé pour plusieurs raisons : soit parce que dans un extrait de culture jeune, il est consommé au cours d'une réaction ou que son activité est inhibée, soit que la méthode de dosage ne permette pas d'apprécier de faibles quantités d'enzyme. Nous avons éliminé ces possibilités.

Suivant le deuxième groupe d'hypothèses, le temps de latence d'apparition de l'enzyme serait dû au fait que l'inducteur est un stéroïde : en effet, on a retrouvé ce phénomène avec de nombreuses structures de ce type et la faible concentration que l'on obtient dans le milieu de culture serait un point commun à ces composés. Il est vrai que l'on constate une légère augmentation de la solubilité (de 80 à 100 mg par litre) lorsque les bactéries se multiplient, mais elle n'est pas suffisante pour justifier l'importance du retard d'apparition de l'enzyme. L'addition de tween 80 (0,1%), de protéine ou enfin l'utilisation de structure particulièrement soluble (phosphate de déhydro-épi-androstérone) ne modifient pas ce temps.

Dans un troisième cas, on avance que la testostérone pénètre lentement et que son accumulation est progressive à l'intérieur de la bactérie; il faudrait donc un certain temps pour que le taux intracellulaire soit suffisamment élevé et impressionne le mécanisme initiateur de l'induction. Or, l'incorporation de la testostérone 4C¹⁴ par une culture en phase exponentielle est d'emblée maximum. Le dosage de la testostérone intracellulaire libre à 254,5 m μ ne montre pas également d'accumulation de ce stérol, alors même que l'enzyme apparaît.

L'étude plus précise de l'incorporation de la testostérone 4C¹⁴ par une culture non proliférante (milieu G-HC neuf avec 50 μ g par ml de chloramphénicol) ne montre pas de différence, que les bactéries aient été ou non induites au préalable : on a pu calculer que chaque bactérie incorpore au temps 0 : 9.10^{-12} μ M. Ces faits prouvent que la difficulté de pénétration de la testostérone ou qu'un processus de perméation inductible n'est pas en cause, à la condition que ce dernier soit insensible à la composition du milieu de culture.

Dans le dernier groupe d'hypothèses, la testostérone ne serait pas le véritable inducteur, cet effet étant dû aux dérivés de ce stérol (induction séquentielle). Les incubations en présence de ces métabolites isolés ou associés tels qu'ils sont obtenus par action de *Pseudomonas testosteroni*, montrent que, dans les conditions de culture employées, la testostérone est bien inductrice par elle-même et ses dérivés le sont également au même titre qu'elle.

C H A P I T R E V I

TEMPS DE LATENCE D'APPARITION DE L'ENZYME

3 α -HYDROXYSTEROIDE : NAD-OXYDOREDUCTASE

INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE.

TEMPS DE LATENCE D'APPARITION DE L'ENZYME
3 α -HYDROXYSTEROIDE : NAD-OXYDOREDUCTASE
INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE.

Nous avons vu que le milieu utilisé est le milieu "G-HC", contenant principalement 8g de glucose et 5g d'hydrolysate de caséine par litre, et nous avons eu l'occasion de justifier ce choix (chapitre II).

Puisqu'aucune des hypothèses que l'on a soulevées précédemment n'a été vérifiée, le rôle des constituants de ce milieu de culture a été exploré (MICHEL-BRIAND, 1967). La longueur particulièrement importante du temps de latence est d'ailleurs en faveur de l'intervention de ces produits. Successivement ont été étudiées : l'influence du glucose, de l'hydrolysate de caséine et des constituants de cet hydrolysate.

I.- RÔLE DU GLUCOSE.

On sait que le glucose, ajouté comme seule source de carbone, ne permet pas d'assurer la croissance de *Pseudomonas testosteroni*. Il n'est donc pas métabolisé. Associé à l'hydrolysate de caséine, nous constatons qu'il en est de même. Des dosages effectués toutes les 20 minutes, durant les 6 premières heures de culture montrent la persistance de la quantité initiale de glucose. Son rôle dans le temps de latence d'apparition de l'enzyme peut donc être éliminé: en effet la culture sur un milieu dépourvu de cet hexose (figure 50) met en évidence que l'enzyme apparaît toujours avec le même temps de latence, quelque soit l'importance de l'inoculum; avec un inoculum de densité trois fois supérieure, on constate que l'enzyme n'est décelé que 3 heures après addition de l'inducteur. Le rôle du glucose étant éliminé, l'influence de l'hydrolysate de caséine est exploré dans les manipulations suivantes :

II.- RÔLE DE L'HYDROLYSAT DE CASEINE.

Les cultures sont effectuées dans la solution de base à laquelle 5g d'hydrolysate de caséine sont incorporés (milieu HC).

1°- Mise en évidence du rôle de l'hydrolysate. On effectue une culture non

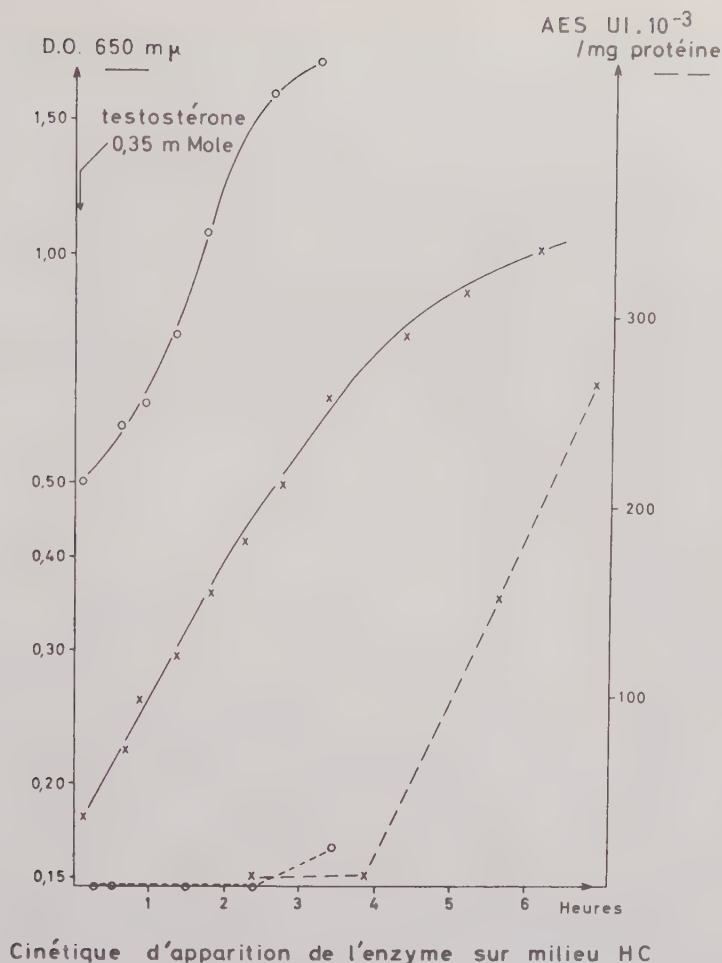


FIGURE 50

induite sur milieu HC. 3h30 après l'inoculation, la culture sur ce milieu que nous appellerons "épuisé" est séparée en deux parties.

A l'une d'elles on ajoute de la testostérone (0,35 mMole), à l'autre la même quantité de testostérone et 5g par litre d'hydrolysate de caséine (figure 51). On voit que dans la culture où l'on n'a ajouté que l'inducteur, l'enzyme apparaît 30 minutes après l'addition de testostérone, alors qu'il faut toujours environ 3 heures pour que cet enzyme soit décelé lorsque l'hydrolysate de caséine a été incorporé au milieu. Cette dernière substance semble bien être directement responsable du temps de latence d'apparition de l'enzyme, et nous avons cherché à rapporter ce fait à un constituant particulier de l'hydrolysate.

2°- Détermination de la composition en acides aminés. La caséine du lait de vache étant essentiellement constituée de phosphoprotéides, aux-

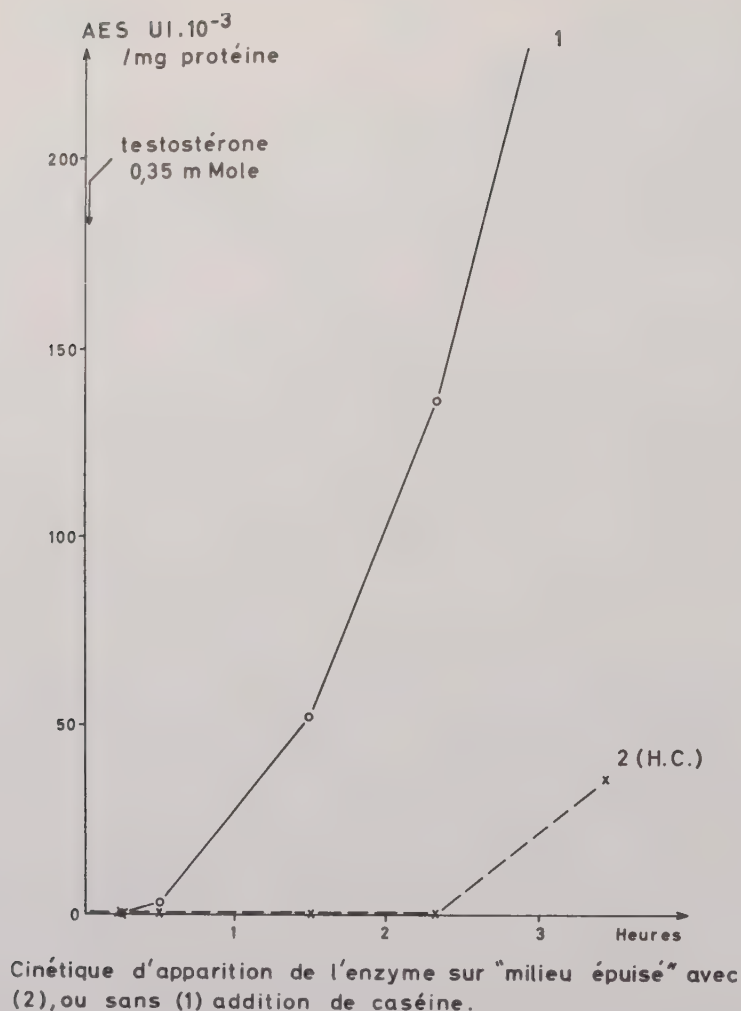


FIGURE 51

quels sont associées de faibles quantités de glucose et d'acides α -cétoniques, il nous a semblé que la détermination de la composition en acides aminés était indispensable. Elle a été effectuée à l'auto-analyseur BECKMAN 120 B, sur colonne PA 35 pour les acides aminés basiques et sur colonne AA 15 pour les autres acides aminés. La nature et la concentration en μ Mole par mg de poids sec d'hydrolysats sont portées dans le tableau 23. L'acide glutamique, la proline, la leucine sont quantitativement les plus importants.

Nous avons vérifié que l'hydrolysats utilisé n'est bien formé pratiquement que d'acides aminés et qu'il ne subsiste par conséquent aucun polypeptide ni oligopeptide. En effet, l'azote total, calculé d'après la teneur en acides aminés est de 73 μ g par mg de poids sec d'hydrolysats, alors que l'azote total obtenu par dosage suivant la méthode de KJELDAHL est de 75 μ g.

COMPOSITION DE L'HYDROLYSAT DE CASEINE

Acide aminé	μ Mole dans 1 mg de poids sec
Glycine	0,149
Alanine	0,215
Valine	0,347
Leucine	0,476
Isoleucine	0,199
Sérine	0,272
Thréonine	0,183
Méthionine	0,219
Cystine	0,052
Phénylalanine	0,112
Tyrosine	0,036
Proline	0,650
Histidine	0,113
Lysine	0,291
Arginine	0,090
Ac. glutamique	0,722
Ac. aspartique	0,298

TABLEAU 23

III.- RÔLE DES ACIDES AMINÉS SUR LA PRODUCTION D'ENZYME.

L'intervention des acides aminés dans la genèse du temps de latence d'apparition du 3 α -enzyme est explorée de la même manière que pour l'hydrolysate lui-même. Ces produits, sous forme L, sont ajoutés à un milieu "épuisé" à la concentration où ils se trouvent dans l'hydrolysate (figure 52). Ils déterminent le même phénomène. On élimine une interférence éventuelle entre acides aminés et milieu épuisé, en réalisant une culture sur un milieu neuf formé d'une solution de base et d'acides aminés (figure 53). Le temps de latence est toujours le même. Nous pouvons donc bien le rapporter à la seule présence de ces produits et non pas à d'autres substances apportées par la caséine. En effet, WELCH (1965) a montré que certains déoxy-ribonucléosides peuvent inhiber la synthèse de 3 α -enzyme.

Pour tenter de trouver le ou les amino-acides en cause, nous les avons séparés arbitrairement en deux groupes I et II, chacun d'eux contenant des composés soufrés et diamminés :

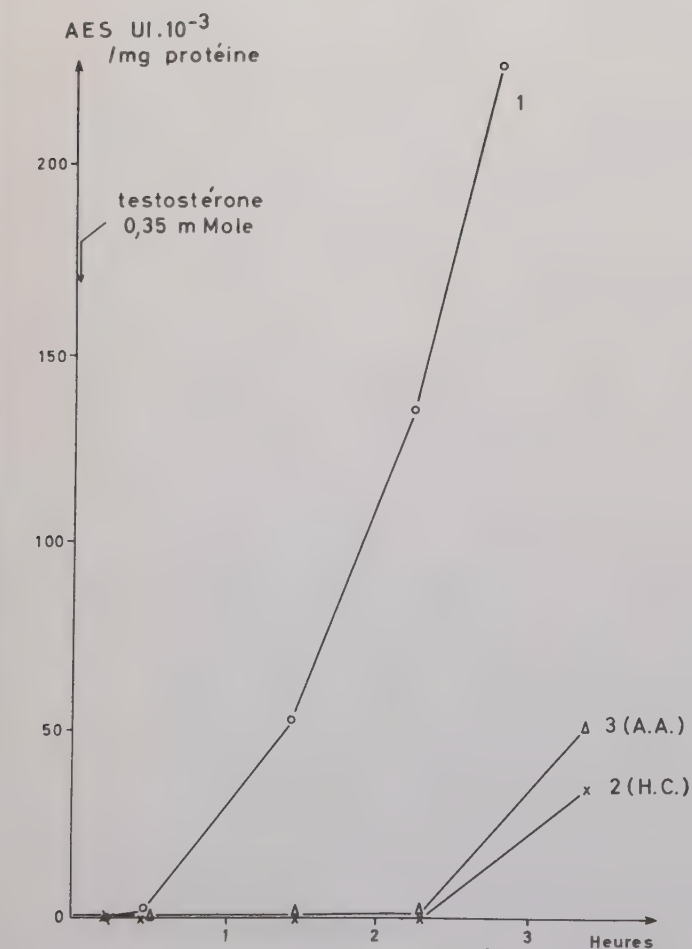
GROUPE I

L-Cystine
L-Phénylalanine
L-Tyrosine
L-Lysine
Acide L-Glutamique
Acide L-Aspartique

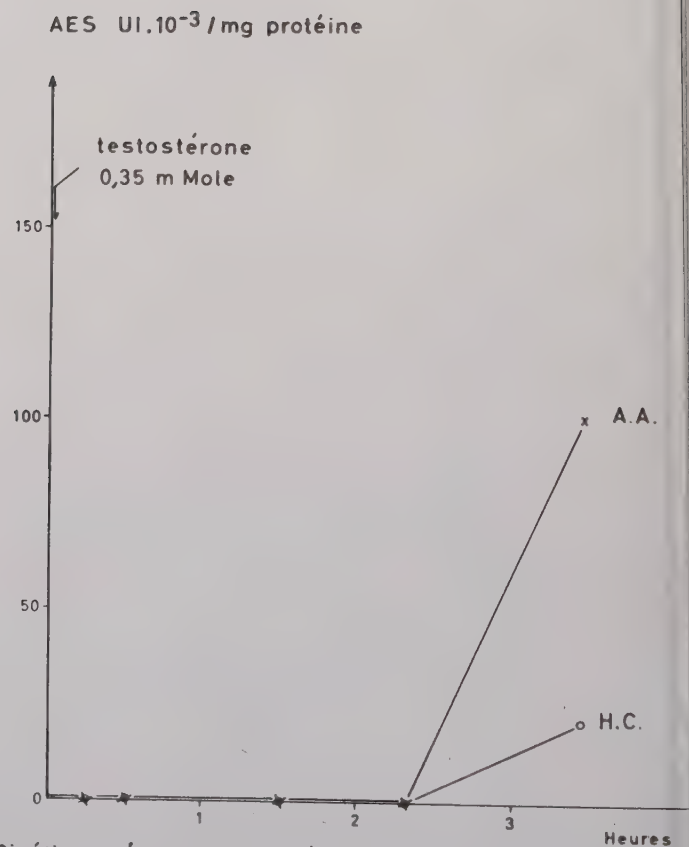
GROUPE II

Glycine
L-Alanine
L-Valine
L-Leucine
L-Isoleucine
L-Méthionine
L-Proline
L-Histidine
D L-Sérine
D L-Thréonine
L-Arginine

- 0 -



Cinétique d'apparition de l'enzyme sur "milieu épuisé" (1), avec addition d'hydrolysate de caséine (2), ou d'acides aminés (3)



Cinétique d'apparition de l'enzyme sur milieu de base avec addition d'hydrolysate de caséine ou d'acides aminés

FIGURES 54-53

Nous constatons alors que les cultures effectuées sur le groupe I donnent régulièrement un temps de latence d'apparition de l'enzyme 3 α , alors que celles sur le groupe II ne le donnent pas. On peut donc penser qu'un acide aminé contenu dans le groupe I peut jouer le rôle d'un répres-seur.

Les cultures effectuées en présence d'un seul acide aminé comme source de carbone, à la concentration de 5 mM, ne nous ont pas permis de donner une réponse nette : à côté de l'acide glutamique inhibant la pro-duction d'enzyme aussi totalement, durant les premières heures (on n'a suivi l'apparition de l'enzyme que durant 3h30) que le mélange d'acides aminés du groupe I, d'autres acides aminés ont un pouvoir inhibiteur va-riable : la production d'enzyme passant de 37.10^{-3} UI par mg de protéine pour la tyrosine, à 660.10^{-3} UI par mg de protéine pour la lysine.

Il est donc nécessaire de préciser l'influence des acides aminés, non seulement sur la production d'enzyme mais aussi sur la physiologie de la bactérie, en particulier sur la croissance.

IV.- ROLE DES ACIDES AMINES SUR LA PRODUCTION D'ENZYME ET SUR LA CROIS-SANCE.

1°- Si nous analysons les courbes de croissance de *Pseudomonas testoste-roni* en présence des deux groupes d'acides aminés, nous notons les faits suivants (figure 54) : une culture en voie de multiplication (sur groupe I d'acides aminés) ne donne pas d'enzyme, alors qu'une culture en phase stationnaire en produit rapidement. On peut même noter que c'est lorsque la culture entre en phase stationnaire (sur groupe I) que l'enzyme appa-rait.

2°- Nous retrouvons des résultats analogues, lorsque la culture est effec-tuée en présence d'un acide aminé. Tous les constituants de l'hydrolysât de caséine ne sont pas utilisés par la bactérie. Des essais préliminaires en présence de chacun d'eux montrent les acides aminés permettant la croissance de *Pseudomonas testosteroni* après 48 heures d'incubation (ta-bleau 24).

Il est à remarquer que ces acides aminés interviennent uniquement ici en tant que seule source de carbone, les autres besoins étant assurés par les constituants du milieu de culture.

L'analyse des résultats de la production d'enzyme peut être conduite

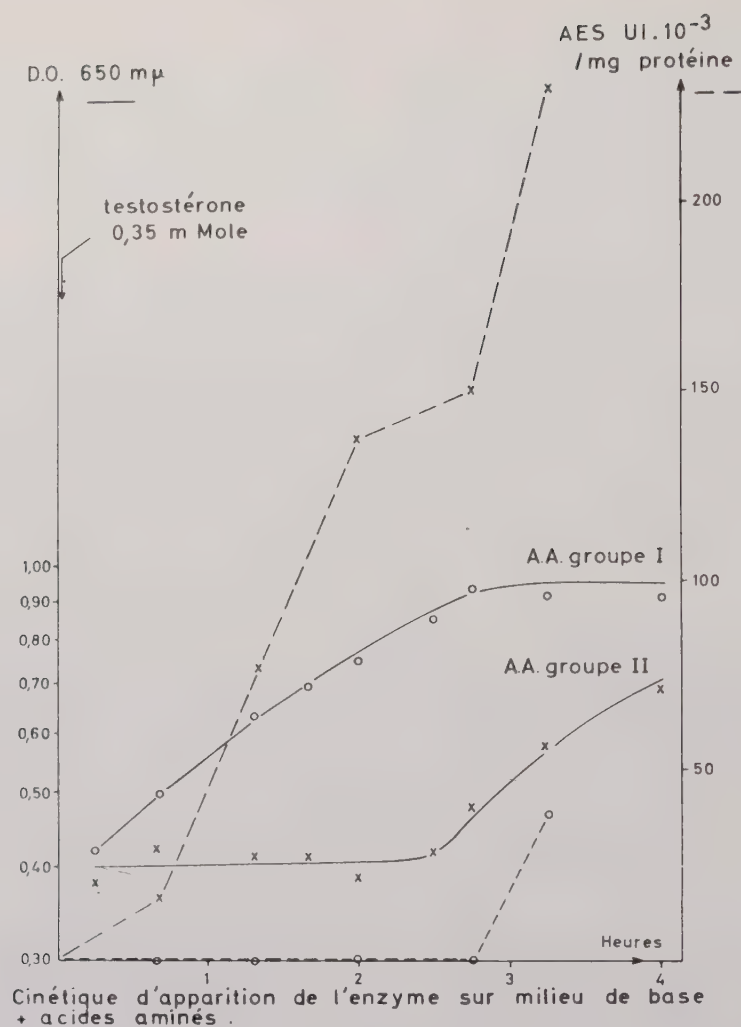


FIGURE 54

Acide aminé	Croissance	Acide aminé	Croissance
glycine	+	DL-sérine	0
L-alanine	+	DL-thréonine	0
L-valine	+	DL-méthionine	0
L-leucine	+	L-cystine	0
L-isoleucine	+	L-lysine	0
L-phénylalanine	+	L-arginine	0
L-tyrosine	+		
L-proline	+		
L-histidine	+		
Acide L-glutamique	+		
Acide L-aspartique	+		

TABLEAU 24

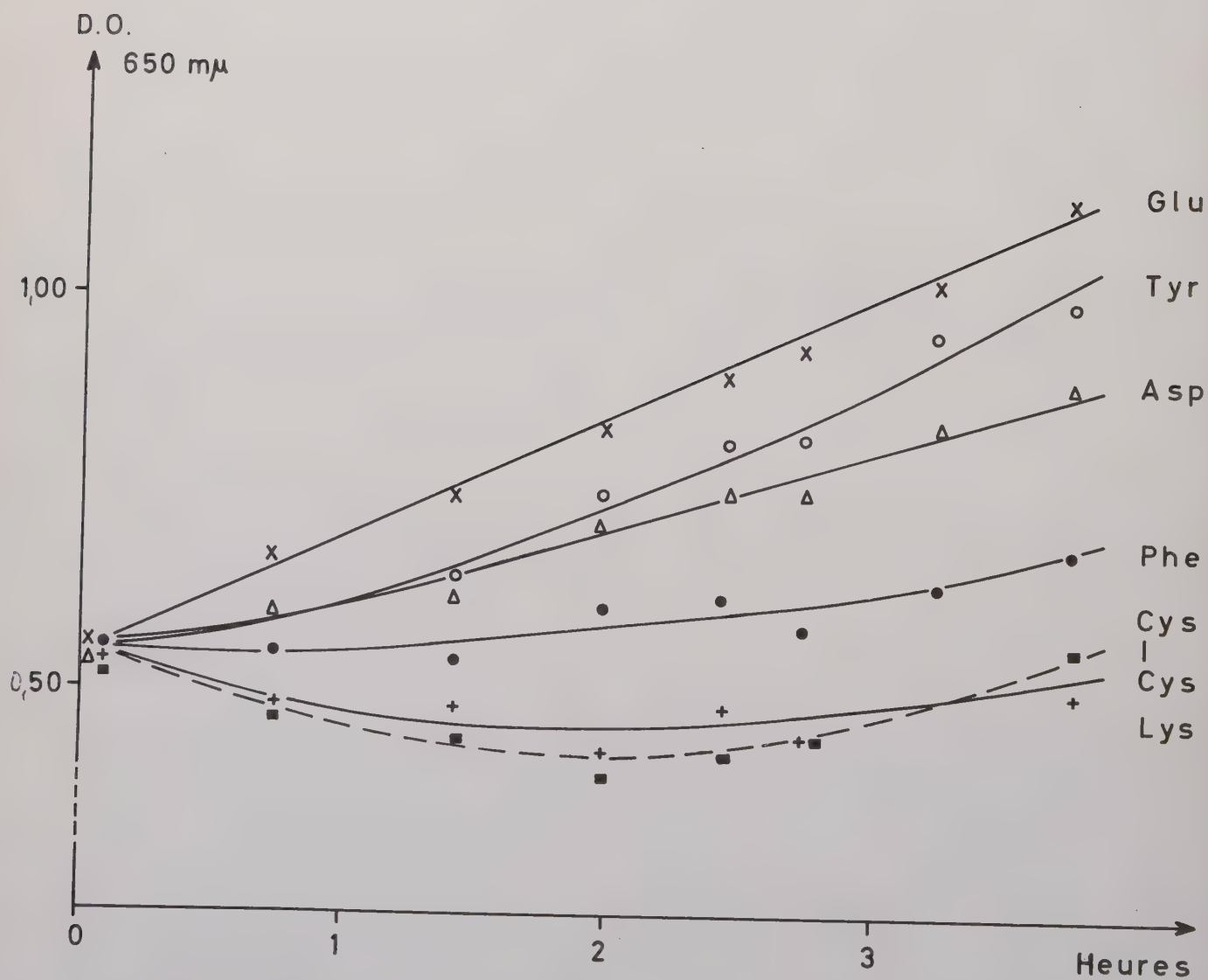
suivant que l'acide aminé est métabolisable par la bactérie ou ne l'est pas.

A)- lorsque l'acide aminé est utilisé par la bactérie, on peut dire schématiquement que l'effet retard sur la production d'enzyme est inversement proportionnel à la valeur du taux de croissance (figures 55 et 56). Parmi les acides aminés du groupe I, utilisés à la concentration de 5 mM, l'acide glutamique donne le taux de croissance le plus élevé (0,186). Ensuite viennent la tyrosine (0,113) malgré une courbe de croissance particulière correspondant à une phase d'accélération, l'acide aspartique (0,065) et la phénylalanine (0,015). Bien que la valeur du taux de croissance soit faible, on peut cependant noter que l'effet des acides aminés sur la production d'enzyme est dans l'ordre inverse. La phénylalanine permet une synthèse précoce (35 minutes) et élevée ($470 \cdot 10^{-3}$ UI par mg de protéine après 3h30). L'acide glutamique ne donne pratiquement pas d'enzyme.

B)- lorsque l'acide aminé n'est pas métabolisé par la bactérie et que le milieu de culture ne contient pas d'autres sources de carbone, la production est précoce et aussi importante qu'avec la phénylalanine. Une concentration dix fois supérieure (50 mMole) d'un acide aminé non utilisé, donc incapable d'augmenter le taux de croissance, ne modifie pas sensiblement la cinétique de production de l'enzyme (figure 57). La synthèse est donc indépendante de la composition du milieu de culture, quand ce dernier ne modifie pas le taux de croissance de la bactérie. Nous arrivons à cette conclusion que l'hydrolysate de caséine n'agit pas par la nature propre de ses constituants, mais par les modifications métaboliques qu'il crée dans la cellule. C'est pour ces raisons que nous avons changé les conditions de l'induction. Au lieu d'utiliser comme jusqu'à présent des bactéries en phase exponentielle, que nous mettons en contact avec l'inducteur dans un nouveau milieu permettant à la croissance de se poursuivre, nous allons effectuer l'induction avec des bactéries non proliférantes.

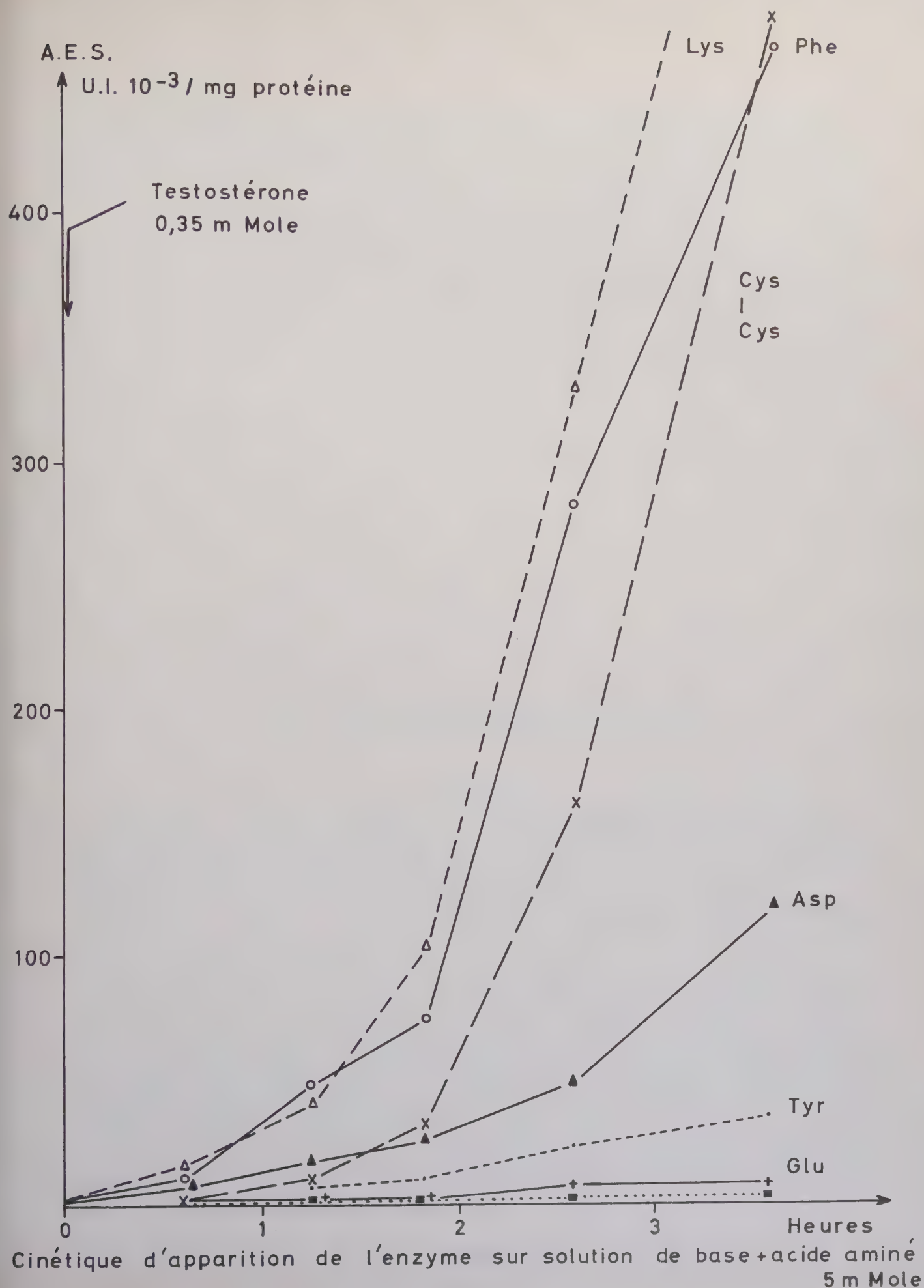
V.- RÔLE D'UN MILIEU INCAPABLE D'ASSURER LA MULTIPLICATION BACTÉRIENNE.

Nous utilisons trois types de milieux (figure 58). Le premier type correspond au milieu HC "épuisé", ne permettant plus d'assurer la multiplication bactérienne. Le deuxième est formé par la solution de base, apportant donc une source d'azote, mais aucune source de carbone. La troisième solution est un milieu tampon phosphate de SÖRENSEN (pH 7,2; 0,015



Courbe de croissance de *Ps. testosteroni* sur solution de base + acide aminé 5 mMole.

FIGURE 55 - FIGURE 56 (ci-contre)



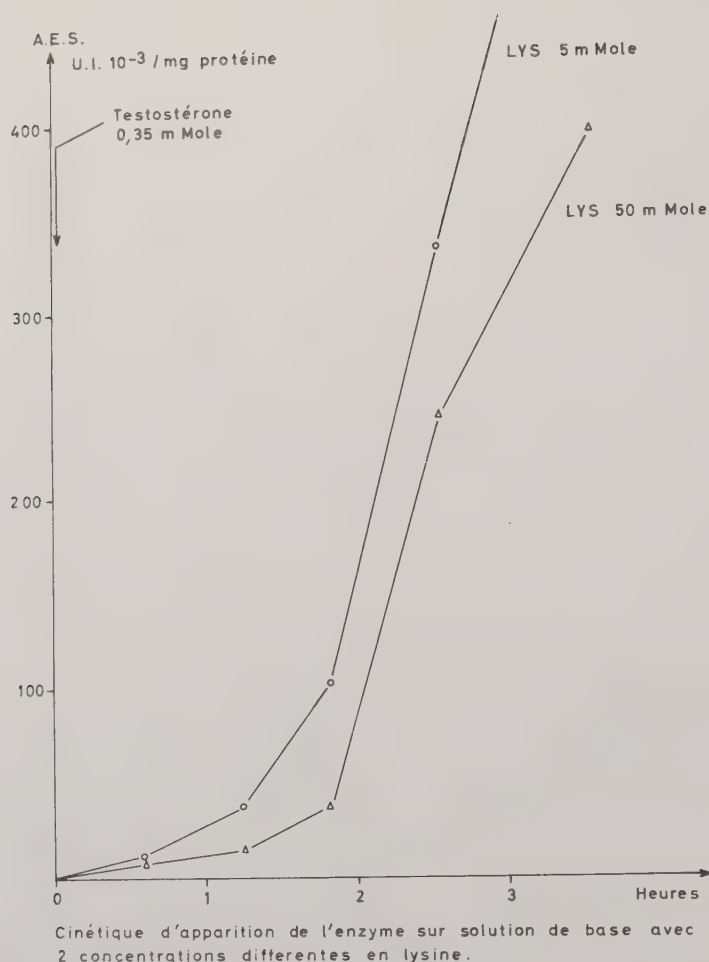


FIGURE 57

M), dépourvu par conséquent de source de carbone et d'azote. Après ensemencement de chacun de ces milieux par des bactéries en phase exponentielle et addition de 0,35 mMole de testostérone, on suit l'apparition de l'enzyme. Dans les trois cas, on note que malgré une cinétique différente, l'enzyme apparaît précocement.

La synthèse de la protéine reste cependant induite. En effet, si on ajoute 0,35 mMole de testostérone à une culture en phase stationnaire obtenue à partir du milieu HC (figure 59), la production d'enzyme est précoce et augmente presque linéairement (courbe en trait plein). Si une fraction de ce milieu est isolée aux temps 0, 1h15, 2h45 et que l'on ajoute du chloramphénicol (50 μ g/ml), on constate que 2h30 après, l'activité enzymatique spécifique n'a pas augmenté d'une quantité significative : ainsi au temps 1h15, les cellules donnent des extraits dont l'AES est de $61 \cdot 10^{-3}$ UI par mg de protéine; 2h30 après, aux cellules qui ont été en

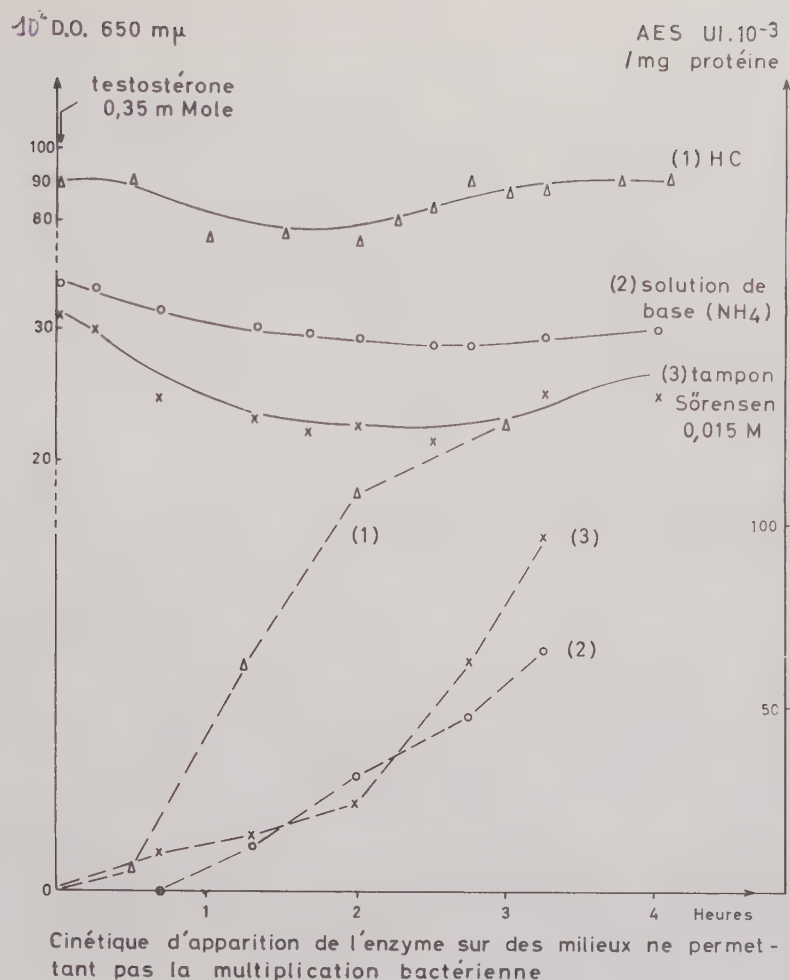


FIGURE 58

contact avec le chloramphénicol correspond une AES de $76 \cdot 10^{-3}$ UI par mg de protéine; quant aux bactéries non soumises à l'action de cet antibiotique, l'AES des extraits est de $214 \cdot 10^{-3}$ UI par mg de protéine.

VI.- INTERPRETATION DE CES FAITS.

La régulation du métabolisme de synthèse d'une substance peut se réaliser de deux manières sur les enzymes participant à cette voie : soit par inhibition de leur activité, soit par arrêt de leur synthèse. L'inhibition de l'activité (NOVICK, 1954) est due au seul produit terminal de la chaîne de biosynthèse (rétro-inhibition, feed-back) qui agit sur le premier enzyme de la séquence, par modification de la structure tertiaire et quaternaire de la protéine enzymatique, dite allostérique. L'arrêt de la synthèse (COHN, COHEN, MONOD - 1953) s'en différencie, en particulier

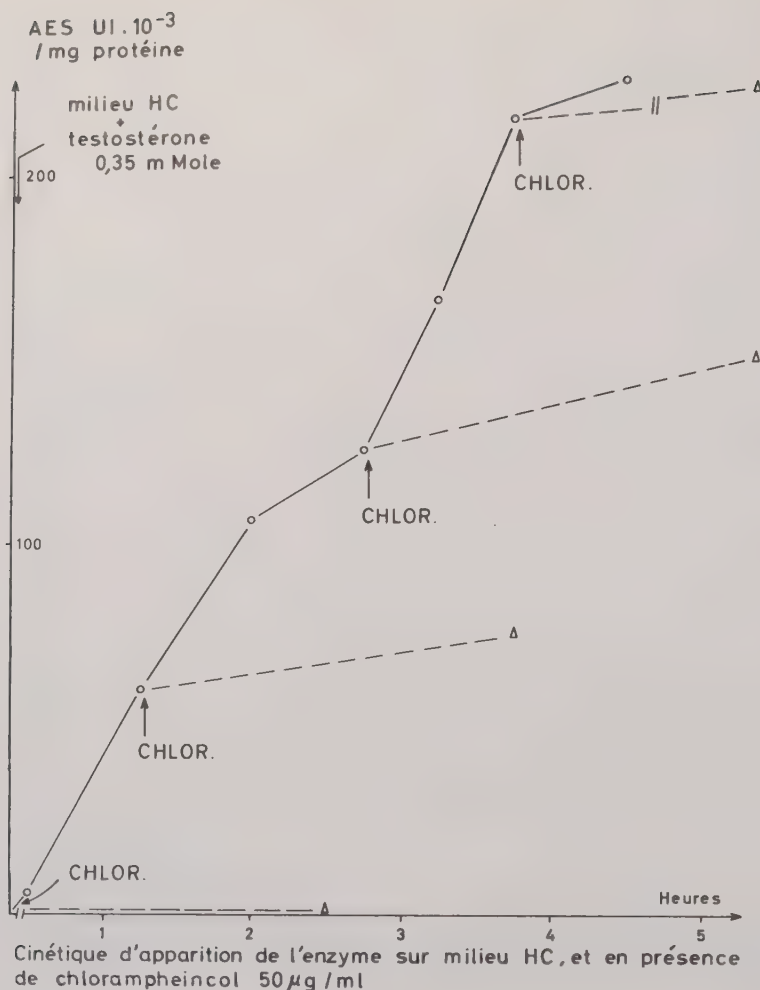


FIGURE 59

par action du produit formé sur tous les enzymes d'une même chaîne métabolique. Et lorsqu'un dérivé est commun à plusieurs séquences (chaîne métabolique ramifiée), il y a autant d'enzymes différents pouvant le former que de séquences possibles (STADTMAN, COHEN - 1961).

La régulation du métabolisme de dégradation peut se faire par induction ou par répression catabolique. Dans le premier cas, les enzymes de dégradation ne sont produits que si leurs substrats ou des composés chimiquement voisins sont présents. Dans le deuxième cas, certains catabolites, dus au glucose en particulier, inhibent la formation des enzymes, même en présence de l'inducteur (MAGASANIK, 1961). Ces deux modes de régulation peuvent être présents pour le même système enzymatique, bien que leurs localisations génétiques soient différentes (LOOMIS, MAGASANIK - 1965).

L'enzyme 3 α n'intervient pas dans le métabolisme de biosynthèse, ni dans la dégradation de la testostérone. A quel type de régulation peut-on alors rattacher les faits observés ?

1'.- Le phénomène que l'on a noté correspond à la régulation de la synthèse de l'enzyme 3 α , non de son activité. En effet lorsque l'enzyme est formé, les essais de modification de son activité donnent les résultats suivants :

A.- L'incubation in vitro d'extrait de culture riche en enzyme, avec des extraits de culture jeune où l'enzyme n'est pas encore apparu, ne modifie pas l'activité de l'enzyme.

B.- L'incubation de différents acides aminés avec des extraits enzymatiques bruts donne des effets inhibiteurs dont la valeur est portée dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU 25

POURCENTAGE D'INHIBITION DES ACIDES AMINES
A LA CONCENTRATION 10^{-2} M.

L-glycine	3%	L-leucine	7%
L-alanine	3%	L-isoleucine	17%
L-proline	0%	L-norleucine	3%
		Acide L-glutamique	18%
		Acide L-aspartique	27%

On constate qu'un effet inhibiteur pouvant avoir une signification physiologique, ne peut être obtenu que pour l'acide aspartique et à des concentrations de 10^{-2} M, donc nettement supérieures aux concentrations intracellulaires normales. Il faut cependant noter que dans nos cultures, ces acides aminés sont employés principalement comme source de carbone. Les besoins de la cellule sont donc 20 à 30 fois plus importants en ces acides aminés, que si ces produits intervenaient uniquement comme source d'azote. Les molarités intracellulaires pourraient dans certaines conditions être assez élevées et se rapprocher de 10^{-2} M.

C.- Une "culture induite" (effectuée en présence de testostérone et datant de 4 heures, donc formée de bactéries induites) à laquelle on ajoute de l'hydrolysate de caséine (figure 60-1) est constituée de bactéries dont le taux d'enzyme reste pratiquement constant, alors que dans une culture témoin (2) où l'on n'a pas ajouté de caséine, les bactéries ont un taux d'enzyme qui va en croissant. Cette expérience montre que,

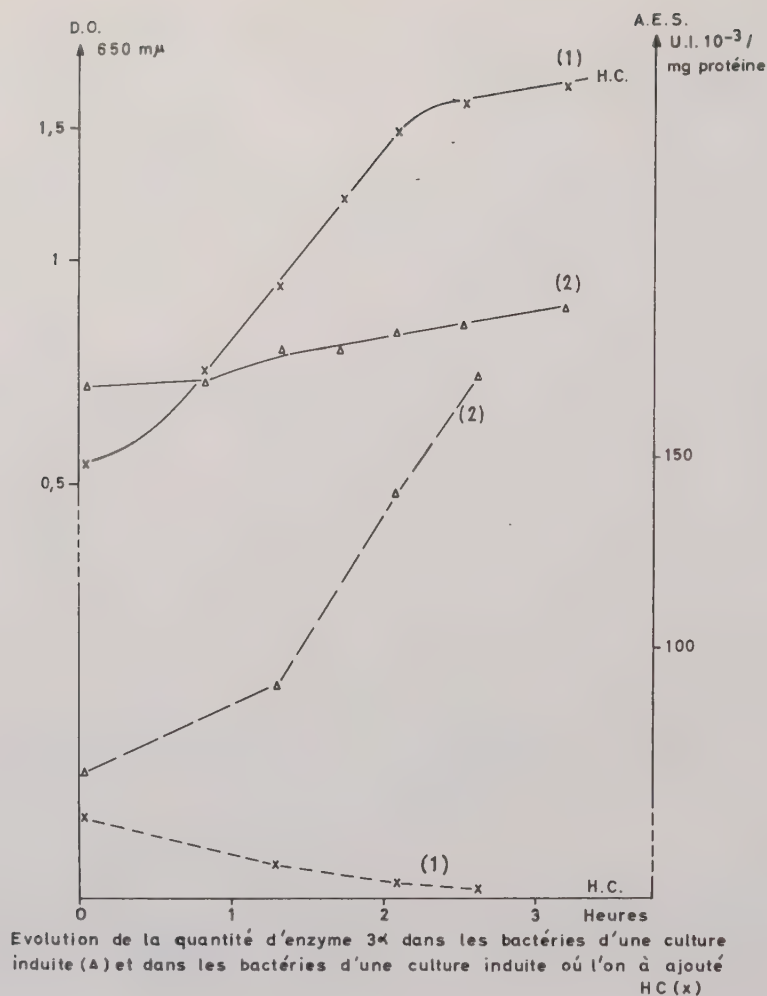


FIGURE 50

"in vivo" également, l'enzyme formé n'a pas son activité inhibée par l'hydrolysate de caséine ou ses dérivés. Seule la synthèse d'une nouvelle quantité ne peut avoir lieu.

De ces résultats et malgré les réserves émises en B, on peut conclure que la régulation de l'activité de l'enzyme n'intervient pas.

2°. La latence d'apparition de l'enzyme 3α suggère plutôt une répression de type catabolique, telle que l'a définie MAGASANIK (1961). Cet auteur appelle ainsi le phénomène connu sous le nom d' "effet glucose".

Cet effet répressif se manifeste quand on ajoute du glucose, mais aussi d'autres oses (galactose). Il est dû essentiellement à des catabolites de ce substrat.

Il s'exerce sur la synthèse d'enzymes, dont certains peuvent être induits. L'activité de ces enzymes ne contribue pas à la croissance de la cellule et, dans certains cas, ne ferait qu'augmenter la production de ces catabolites.

Cette définition semble bien s'appliquer au phénomène observé avec l'enzyme 3 α : le fait original est que ce sont des acides aminés qui exercent cet effet, mais ces substances, on l'a vu, sont utilisées par la bactérie en tant que source de carbone. Tous les acides aminés ne sont pas inhibiteurs : les plus actifs sont principalement ceux qui constituent les "plaques tournantes" du métabolisme, l'acide glutamique en donnant l'acide α -cétoglutarique et l'acide aspartique, l'oxaloacétate.

On sait par ailleurs, que la dégradation de la testostérone par *Pseudomonas testosteroni* donne tout d'abord le 3,17-dioxo, androsta, 4-ène puis différents stéroïdes (cf. chapitre II), le catabolisme se poursuivant probablement par l'intermédiaire du cycle de Krebs (TALALAY, 1952) pour donner du gaz carbonique et de l'eau. SHAW et TALALAY (1965) ont signalé d'autre part que l'incubation du 3,17-dioxo, androsta, 4-ène avec un extrait bactérien induit et en présence d'acide éthylène diamine tétraacétique donne un dérivé seco en 9-10, puis en 4-5, la dégradation se poursuivant pour donner l'acide trans L 2-amino, 4-hexénoïque. Ce dernier produit donnant ensuite de la L-alanine en particulier. Mais il y a formation de plusieurs autres dérivés dont l'identification n'a pas été poursuivie.

Certes l'enzyme 3 α n'intervient pas dans cette chaîne métabolique, mais notre propre expérience avec le 3 (ou 17) β -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase et les conclusions de WACKER (1965) sont en faveur de la synthèse coordonnée du 3 α -enzyme et des enzymes intervenant dans le métabolisme de la testostérone.

La comparaison entre le métabolisme des acides aminés et celui de la testostérone, montre donc qu'il y a des composés communs à ces deux voies. On peut donc penser que lorsque ces produits (formés à partir de la première voie) sont en excès, ils inhibent la synthèse coordonnée des enzymes dégradant la testostérone et du 3 α -enzyme.

Ce mécanisme semble possible puisque COHN et HORIBATA (1959) ont montré que la répression catabolique exerce ces effets d'une manière coordonnée sur les membres de l'opéron β -galactosidase.

Ce mécanisme semble déborder largement le cadre de l'induction du

3 α -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase de *Pseudomonas testosteroni*, car un phénomène analogue est retrouvé pour d'autres enzymes produits par divers microorganismes : NESEMAN (1960) signale que le 20 β -hydroxystéroïde-déshydrogénase de *Streptomyces hydrogénans* cultivé sur un milieu complexe à la caséine et à l'extrait de viande, n'apparaît que 2 à 3 heures après l'addition de stérol. SIH (1962) et DODSON (1962) donnent des résultats analogues avec *Nocardia restrictus* ou *Xylaria sp.* On peut supposer que le mécanisme que l'on vient de proposer est peut-être lié à certaines familles bactériennes présentant des facultés d'adaptation particulières ou plus vraisemblablement à la nature même de l'inducteur. Le travail récemment publié par WELCH (1965) aborde un aspect différent de l'induction : un nucléoside, le 2'-déoxyadénosine inhibe la synthèse du 3 α -enzyme sans modifier la croissance de *Pseudomonas testosteroni*; l'action de ce composé se ferait par dissociation du complexe inducteur-répresseur. Nous pensons que nos résultats apportent une autre contribution à l'étude de l'induction par les stéroïdes.

VII.- RESUME DU CHAPITRE VI.

Le temps de latence d'apparition de l'enzyme survenant dans un milieu constitué principalement de glucose et d'hydrolysate de caséine, le rôle de ces substances a été étudié. Le fait que l'hydrolysate de caséine employé comme seule source de carbone d'un milieu neuf, ou ajouté à une culture en contact depuis 3 heures avec l'inducteur, retarde l'apparition de l'enzyme, est en faveur du rôle propre de cette substance. Parmi les constituants de l'hydrolysate, nous avons pu rapporter ce retard à la seule présence des acides aminés. Pour tenter de trouver le ou les acides aminés en cause, nous avons testé chacun d'eux à la concentration de 5 mM, mais nous n'avons pas pu classer simplement ces composés en inhibiteur ou non de la synthèse de l'enzyme. L'étude précise de leur influence sur la croissance bactérienne et la production d'enzyme montre que cette dernière est inversement proportionnelle au taux de croissance de *Ps. testosteroni*, si bien que l'acide glutamique, donnant un taux de croissance de 0,186, réprime presque totalement la synthèse de 3 α -enzyme alors qu'un amino-acide non métabolisé, tel que la lysine permet une synthèse précoce et importante (AES de l'extrait bactérien correspondant à la 3ème heure : $450 \cdot 10^{-3}$ UI par mg de protéine). On comprend dans ces conditions que la production de la protéine enzymatique puisse avoir lieu dans un milieu incapable d'assurer la croissance bactérienne, et même qu'elle se manifeste quand la multiplication cesse.

Ces faits correspondent à la régulation de la synthèse d'un enzyme et non de son activité puisque l'incubation de l'extrait en présence de concentration de 10^{-2} M d'acide aminé ne donne pas lieu à une inhibition pouvant avoir un rôle physiologique. La latence d'apparition de l'enzyme 3 α suggère donc une répression de type catabolique, telle que l'a définie MAGASANIK en 1961 : certains acides aminés et, parmi eux, ceux qui constituent des plaques tournantes du métabolisme inhibent la synthèse de 3 α -enzyme. Et cette inhibition ne serait possible que parce que cette synthèse est coordonnée avec celle d'autres enzymes dont le fonctionnement ne ferait qu'augmenter la production de métabolites communs avec ceux obtenus par dégradation des acides aminés

RESUME ET CONCLUSIONS SUR NOS RESULTATS PERSONNELS.

Nous nous étions proposé au début de ce travail d'apporter une contribution à la spécificité de l'induction chez *Pseudomonas testosteroni*, et d'élucider le mécanisme du temps de latence d'apparition de l'enzyme 3 α -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase.

Pour mener à bien cette étude, nous avons précisé les meilleures conditions de culture de cette bactérie en l'absence de stérol : l'acide succinique associé à des oligo-éléments s'est révélé être le meilleur substrat, à pH 7,0 et sous forte agitation. L'introduction de testostérone ou de tout autre stéroïde au milieu de culture nous a amené à modifier ces conditions. Il est en effet nécessaire que le stérol soit totalement soluble. Or il a été noté que pour un même produit, la concentration obtenue augmente avec la complexité du milieu et particulièrement sa richesse en protéine. C'est pour cela que nous avons choisi le milieu proposé par WACKER (1965), suffisamment complexe pour permettre la solubilisation de 0,35 mMole de stérol, et assez défini pour éviter l'apport de stérol contaminant.

Nous avons précisé dans ces conditions l'ordre d'apparition des dérivés de la testostérone en isolant et en identifiant chacun d'eux; nous proposons une séquence différente de celle donnée par LEVY (1959a).

Certains détails de la physiologie de *Pseudomonas testosteroni* étant précisés, la nature réellement induite du 3 α -enzyme a été confirmée par les expériences d'induction en présence de chloramphénicol. Il aurait été souhaitable également de démontrer que cette protéine se forme, à partir du moment où l'on ajoute l'inducteur, aux dépens de constituants puisés dans le milieu de culture. Les essais de purification que nous avons entrepris ne permettent que de le supposer, en raison de l'activité enzymatique spécifique relativement faible que nous avons obtenue. Au cours de ce travail, nous avons démontré la nature soluble du 3 α -enzyme.

L'étude des structures et fonctions indispensables à la manifestation de l'effet inducteur a été conduite avec 37 stéroïdes. Pour supprimer les différences possibles entre des cultures recevant l'inducteur, nous avons

défini un pouvoir inducteur I par rapport à un stéroïde de référence, la testostérone.

La solubilité du stérol dans le milieu de culture a été contrôlée chaque fois que cela était possible.

En raison même du nombre important de structures testées, les éléments indispensables pour susciter l'apparition de l'enzyme ont pu être limités à un radical méthyle en C₉ et en C₂₀, une fonction oxygénée située sur le noyau A ou sur le noyau B et facilement accessible, une planéité des cycles A, B, C et le non encombrement de la face α .

Parmi les différentes hypothèses émises sur l'origine du temps de latence d'apparition de l'enzyme, l'inhibition de l'activité enzymatique dans les extraits de culture jeune, la difficulté de pénétration de la testostérone dans la cellule bactérienne, la faible solubilité de l'inducteur n'interviennent pas. Pour démontrer ces faits nous avons appliqué à notre problème soit des méthodes données primitivement dans l'étude de la pénétration des glucides chez *Escherichia coli*, soit des notions sur la physicochimie des stéroïdes. L'intervention d'un processus d'induction type séquentiel ne peut pas être rigoureusement éliminé, mais il a été montré qu'il n'est pas l'élément essentiel du temps de latence. Par une série de manipulations originales nous avons pu mettre en évidence que les constituants du milieu de culture sont les facteurs de ce retard d'apparition de l'enzyme; les acides aminés du milieu glucose hydrolysate de caséine étant plus précisément en cause. L'action n'est pas spécifique d'un de ces composés, mais dépend du rôle de chacun d'eux dans la croissance de *Pseudomonas testosterone*: plus un acide aminé augmente le taux de croissance, moins il permet la synthèse précoce de l'enzyme. Ces faits sont à rattacher à une régulation de type catabolique selon MAGASANIK. Nous pensons que ce mécanisme peut être généralisé à de nombreuses autres observations sur l'induction d'enzyme participant au métabolisme des stérols et qu'il apporte une contribution à un problème rarement abordé dans le domaine de la dégradation microbiologique des stéroïdes.

B I B L I O G R A P H I E

- ALBRECHT K., WIX G. (1966) - Inhibition of Δ^1 -dehydrogenation by Δ^1 -4,3 ceto-steroids. IX Congrès International de Microbiologie, Moscou.
- ANDERSON R.J., CHARGAFF E. (1930) - The chemistry of the lipoids of tubercle bacilli. VI Concerning tuberculostearic acid and phthioic acid from acetone soluble fat. J. Biol. Chem. 85, 77-88.
- BISCHOFF F., STAUFFER R.D. (1954) - The dispersion of testosterone in aqueous bovine serum albumin solution. J. Amer. Chem. Soc., 76, 1962.
- BOYER J. (1964) - Contribution à l'étude du métabolisme des hormones stéroïdiennes. Purification de la 3α -hydroxystéroïde déshydrogénase. Thèse médecine, Marseille.
- BURSTEIN C. (1964) - Contribution à l'étude de l'induction de l'opéron lactose d'*Escherichia coli*. Thèse 3^e cycle, Paris.
- COHEN G.N., RICKENBERG H.V. (1955) - Etude directe de la fixation d'un inducteur de la β -galactosidase par les cellules d'*Escherichia coli*. C.R. Acad. Sci., Paris, 240, 466-468.
- COHEN G.N., RICKENBERG H.V. (1956) - Concentration spécifique réversible des amino-acides chez *Escherichia coli*. Ann. Inst. Pasteur, 91, 692-720.
- COHEN G.N., MONOD J. (1957) - Bacterial permeases. Bact. Rev., 21, 169-194.
- COHN M., MONOD J. (1951) - Purification et propriétés de la β -galactosidase (lactase) d'*Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, 7, 153-174.
- COHN M., COHEN G.N., MONOD J. (1953) - L'effet inhibiteur spécifique de la méthionine dans la formation de la méthionine synthase chez *Escherichia coli*. C.R. Acad. Sci., Paris, 236, 746-748.
- COHN M., HORIBATA K. (1959) - Physiology of the inhibition by glucose of the induced synthesis of the β -galactoside-enzyme system of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 78, 624-635.
- CRASTES DE PAULET A., MICHEL-BRIAND Y. (1966) - On some structures inducing the α and β -steroid-dehydrogenases in *Pseudomonas testosteroni*. II Congrès International sur les stéroïdes hormonaux, Milan.
- DELIN S., PORATH J. (1963) - Purification of α and β -hydroxysteroid dehydrogenases from *Pseudomonas testosteroni* by gel filtration. Biochim. Biophys. Acta, 67, 197-200.
- DELIN S., SQUIRE P.G., PORATH J. (1964) - Purification of steroid induced enzymes from *Pseudomonas testosteroni*. Biochim. Biophys. Acta, 89, 398-408.
- DODSON R.M., MIZURA S. (1962) - The oxidation of androstenedione at C-16. J. Org. Chem. 27, 698.
- DORFMAN L. (1953) - Ultraviolet absorption of steroids. Chem. Rev., 53, 47-144.
- FOSSET M., CRASTES DE PAULET A. (1967) - Contribution à l'étude du site actif de la 3 (ou 17) β -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase de *Pseudomonas testosteroni*. Bull. Soc. Chim. Biol. à paraître.

- FRENCH C.S., MILNER H.W. (1955) - Disintegration of bacteria and small particles by high-pressure extrusion. *Methods in enzymology*, 1, 64-67. Academic Press.
- GALE E.F., FOLKES J.P. (1953) The assimilation of amino-acids by bacteria. Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.*, 53, 493-498.
- GUNSALUS I.C., STANIER R.Y. (1961) - The Bacteria. 2. Chapitre 2. Academic Press.
- HEGEMAN G.D. (1966) - Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I-Synthesis of enzymes by the wild type. *J. Bacteriol.*, 91, 1140-1154.
- HOGNESS D.S., COHN M., MONOD J. (1955) - Studies on the induced synthesis of β -galactosidase in *Escherichia coli*: the kinetics and mechanism of sulfur incorporation. *Biochem. Biophys. Acta* 16, 99-116.
- HORVATH J., KRAMLI A. (1947) - Microbiological oxidation of cholesterol with *Azotobacter*. *Nature London*, 160, 639.
- HUBENER H.J., LEHMAN C.O. (1958) - Die enzymatische 20-Keto-Reduktion durch Extrakte aus *Streptomyces hydrogenans*. *Z. Physiol. Chem.*, 313, 124.
- HUGH R., LEIFSON E. (1953) - The Taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 66, 24-26.
- HUGH R. (1965) - A comparison of *Pseudomonas testosteroni* and *Comamonas terrigena*. *Intl. Bull. Bacteriol. Nomencl. Tax.* 15, 125-132.
- HURLOCK B., TALALAY P. (1957) - Principles of the enzymatic measurement of steroids. *J. Biol. Chem.* 227, 37-52.
- HURLOCK B., TALALAY P. (1958) - 3α -Hydroxysteroid as coenzyme of hydrogen transfer between di- and triphospho-nucleotides. *J. Biol. Chem.* 233, 886.
- JACOB F., MONOD J. (1961) - Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3, 318-356.
- JACOBSON L.A., BERTLAND A.U., GUNSALUS I.C. (1964) - Biochemical relationship of steroids and monoterpenoids in fluorescent *Pseudomonas*. *Bacteriol. Proc.* P 105.
- KALCKAR H.M. (1947) - Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. III. Studies of the enzymes of purine metabolism. *J. Biol. Chem.* 167, 461.
- KEPES A. (1960) - Etudes cinétiques sur la galactoside-perméase d'*Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta*, 40, 70-84.
- LEVY H.R., TALALAY P. (1957) - Enzymatic introduction of double bonds into steroids ring A. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 2658.
- LEVY H.R., TALALAY P. (1959a) - Bacterial oxidation of steroids. I. Ring A dehydrogenations by intact cells. *J. Biol. Chem.* 234, 2009-2013.
- LEVY H.R., TALALAY P. (1959b) - Bacterial oxidation of steroids. II. Studies on the enzymatic mechanism of ring A dehydrogenation. *J. Biol. Chem.* 234, 2014-2021.
- LOOMIS W.F., MAGASANIK B. (1965) - Genetic control of catabolite repression of the *Lac* operon in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20, 230-234.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- MAGASANIK B. (1961) - Catabolite repression. Cold spring harbor symposia on quantitative biology. 26, 249-256.
- MAMOLI L., VERCELLONE A. (1937) - Biochemische Umwandlung von delta 4-Androstendion in delta 4-Testosteron. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 70, 470.
- MANDELSTAM J. (1957) - Turn over of protein in starved bacteria, and its relationship to the induced synthesis of enzyme. Nature. 179, 1179-1181.
- MARCUS P.I., TALALAY P. (1955) - On the molecular specificity of steroid enzyme combinations. The Kinetics of β -hydroxysteroid dehydrogenase. Proc. Roy. Soc. London, série B 144, 116-132.
- MARCUS P.I., TALALAY P. (1956) - Induction and purification of α and β -hydroxysteroid dehydrogenases. J. Biol. Chem. 218, 661-674.
- MICHEL-BRIAND Y., ROUX J., CRASTES DE PAULET A. (1966a) - Essai de quelques structures induisant le 3α -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase de *Pseudomonas testosteroni*. Société de Chimie Biologique. Section de Montpellier (20 mai).
- MICHEL-BRIAND Y., ROUX J., CRASTES DE PAULET A. (1966b) - Caractères de l'induction par la testostérone du 3α -NAD-oxydoréductase de *Pseudomonas testosteroni*. IX Congrès International de Microbiologie, Moscou.
- MICHEL-BRIAND Y. (1967) - Facteurs intervenant dans la latence d'apparition de l'enzyme 3α -hydroxystéroïde : NAD-oxydoréductase de *Pseudomonas testosteroni*. Société de Chimie Biologique, Section de Montpellier (16 mai).
- MONOD J. (1942) - Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Actualités Scientifiques et Industrielles 911, Hermann-Paris.
- MONOD J., COHEN-BAZIRE G. (1951) - Sur la biosynthèse de la β -galactosidase (lactase) chez *Escherichia coli*. La spécificité de l'induction. Biochim. Biophys. Acta 7, 585-599.
- MONOD J., PAPPENHEIMER A.M., COHEN-BAZIRE G. (1952) - La cinétique de la biosynthèse de la β -galactosidase chez *E. coli*, considérée comme fonction de la croissance. Biochim. Biophys. Acta. 9, 648-660.
- MULLER-HILL, RICKENBERG H.V., WALLENFELS K. (1964) - Specificity of the Induction of the enzymes of the *Lac* operon in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 10, 303-318.
- NESEMANN G., HUBENER H.J., JUNK R., SCHMIDT-THOME J. (1960) - 20 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase. Züchtung von *Streptomyces hydrogenans* und Induktion des Enzyms. Biochem. Z. 333, 88-94.
- NEUDERT W., ROPKE H. (1965) - Atlas of steroid spectra. Spring-Verlag. Berlin
- NODA L., KUBY S.A. (1957) - Adenosine triphosphate-adenosine monophosphate transphosphorylase (myokinase). I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit skeletal muscle. J. Biol. Chem. 226, 541-558.
- NOVICK A., SZILARD L. (1954) - Dynamics of growth. Princeton Univ. Press. 21.
- PALLERONI N.J., STANIER R.Y. (1964) - Regulatory mechanisms governing syntheses of the enzymes of tryptophan oxidation by *Pseudomonas fluorescens*. J. Gen. Microbiol. 35, 319-334.
- PEARLMAN W.H., CREPY O. (1967) - Steroid-protein interaction with particular reference to testosterone binding by human serum. J. Biol. Chem. 242, 182.
- PETERSON D.H., MURRAY H.C. (1952) - Microbial oxidation of steroids at carbon 11. J. Am. Chem. Soc. 74, 1871-1872.

- RICKENBERG H.V., COHEN G.N., BUTTIN G., MONOD J. (1956) - La galactoside-perméase d'*Escherichia coli*. Ann. Inst. Pasteur. 91, 829-857.
- ROTMAN B., SPIEGELMAN S. (1954) - On the origin of the carbon in the induced synthesis β -galactosidase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 68, 419-429.
- SANTER M., AJL S.J. (1952) - Steroid metabolism by a species of *Pseudomonas*. II. Direct evidence for the breakdown of testosterone. J. Biol. Chem. 280-328, 199, 85.
- SCHELLMAN J.A., LUMRY R., SAMUELS L.T. (1954) - The binding of uncharged molecules to proteins. II. Testosterone and bovine serum albumin. J. Amer. Chem. Soc. 76, 2808.
- SCOTT A.I. (1964) - Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products. 1 vol. Pergamon Press, London.
- SHAW D.A., BORKENHAGEN I.F., TALALAY P. (1965) - Enzymatic oxidation of steroids by cell-free extracts of *Pseudomonas testosteroni* : isolation of cleavage products of ring A. Biochemistry. 54, 837-844.
- SIH C.J., BENNETT R.E. (1962) - Steroid 1-dehydrogenase of *Nocardia restrictus*. Biochem. Biophys. Acta. 56, 584-592.
- SIH C.J., LEE S.S., TSONG Y.Y., WANG K.C. (1966) - Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms VIII 3,4-dihydroxy, 9,10-seco androsta 1,3,5(10)-triène, 9, 17-dione, an intermediate in the microbiological degradation of ring A of androsta 4-ène, 3,17-dione. J. Biol. Chem. 241, 540-559.
- SQUIRE P.G., DELIN S., PORATH J. (1964) - Physical and chemical characterization of hydroxysteroid dehydrogenases from *Pseudomonas testosteroni*. Biochem. Biophys. Acta. 89, 409-421.
- STADTMAN E.R., COHEN G.N., LE BRAS G., DE ROBICHON-SZULMAJSTER H. (1961) - Feed-back inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 236, 2033-2038.
- STEIN A.M., KAPLAN N.O. (1959) - Relationship of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase to pyridine nucleotide transhydrogenase. Nature.
- STICKLAND L.H. (1951) - The determination of small quantities of bacteria by the biuret reaction. J. Gen. Microbiol. 5, 698-703.
- TALALAY P., DOBSON M.M., TAPLEY D.F. (1952) - Oxydative degradation of testosterone by adaptive enzymes. Nature, London. 170, 620-621.
- TALALAY P., DOBSON M.M. (1953) - Purification and properties of a β -hydroxysteroid dehydrogenase. J. Biol. Chem. 205, 823-837.
- TALALAY P., MARCUS P.J. (1954) - Enzymatic formation of 3 α -hydroxysteroids. Nature, London. 173, 1189.
- TALALAY P., WANG V.S. (1955) - Enzymatic isomerisation of Δ_5 -3 Ketosteroids. Biochem. Biophys. Acta 18, 300-301.
- TALALAY P., MARCUS P.I. (1956) - Specificity, kinetics, and inhibition of α and β -hydroxysteroid dehydrogenases. J. Biol. Chem. 218, 675-691.
- TALALAY P. (1957) - Enzymatic mechanisms in steroid metabolism. Physiol. Rev. 37, 362-389.
- TALALAY P., LEVY H.R. (1959) - The steric and molecular specificity of steroid-dehydrogenases. In "Steric course of microbiological reactions". Ciba fundation. Churchill ed.

- WACKER A., DREWS J., PRATT W.B., LAURENT H., PETZOLDT K. (1965) - Enzyminduktion mit steroiden bei *Pseudomonas testosteroni*. Z. Naturforschg. 206, 547-553.
- WELCH A.D. (1965) - Inhibition by 2'-deoxy adenosine of enzyme induction in *Pseudomonas testosteroni*. Proceed. of Nation. Acad. Sci. USA. 54, 1359-1363.
- WESTPHAL U., ASHLEY B.D., SELDEN G.L. (1961) - Steroid-protein interactions. VII Interactions of progesterone and corticoids with human plasma proteins determined by multiple equilibrium dialysis. Arch. Biochem. Biophys. 92, 441-448.

o

o o

E R R A T A

PAGE	LIGNE	AU LIEU DE	LIRE
	Sommaire		
2	21°	III Résumé 48	III Résumé 52
2, 123	14°, 6°	inter-réaction	interaction
7	figure 1		D x 1000
10	16°	sulfate de manganésium	sulfate de magnésium
14, 122	14°, 8°	quantativement	quantitativement
14	30°	66,6 μ M	66,6 μ M par ml.
60	19°	gradient	gradient
62	figure 24	AES UI x10 ⁻³	AES UI
63	15°	absorbées	adsorbées
84	7°	chapitre III	chapitre V
85	9°	réduction	oxydation
94	36°	soluble	insoluble
100	32°, 33°	présentes...qu'elles	présents...qu'ils
	Bibliographie		
IV	6°	J. Biol. Chem. 280-328 <u>199</u> , 85	J. Biol. Chem. <u>199</u> , 85-89
	26°	Nature	Science. <u>129</u> , 1611-1612

NOTA : Les noms des radicaux incorporés dans une formule ont été orthographiés par erreur avec un e muet, cette lettre étant à conserver si le radical est en fin de formule ou s'il est cité isolément (Bull. Soc. Chim. 1957, 55; 1958, 1207; 1964 supplément au numéro de février).

D E U X I E M E T H E S E

LES PROPRIETES CARACTERISTIQUES
D'UN ENZYME ALLOSTERIQUE

Vu et permis d'imprimer

MONTPELLIER, le

Le Recteur de l'Académie
de MONTPELLIER,

G. RICHARD

Vu et approuvé

MONTPELLIER, le

Le Doyen de la faculté
des Sciences,

A. CASADEVALL

